Einfluß von Thiopental und anderen lipophilen Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Wever

aus Hersfeld

Marburg 1979

Einfluß von Thiopental und anderen lipophilen Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Wever

aus Hersfeld

Marburg 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Vom Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 11. Juli 1979

Tag der mündlichen Prüfung am : 11. Juli 1979

Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein

Mitberichterstatter : Prof. Dr. D. Schachtschabel

Prof. Dr. B. Unterhalt

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie und Lebensmittelchemie der Philipps-Universität Marburg auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein,

dem ich für jegliche Hilfe und Unterstützung Dank sagen möchte.

Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel danke ich für seine wertvollen Ratschläge bei der Einführung in das Arbeitsgebiet der Zellkultur.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0042

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	10
2.1.	Material	10
2.2.	Untersuchung der cerebralen Hexokinase	13
2.2.1.	Darstellung der Hirnhexokinase	13
2.2.2.	Verteilung der intrazellulären Hexokinase-aktivität in vitro	15
2.2.3.	Verteilung der intrazellulären Hexokinase-aktivität in vivo	16
2.2.3.1.	Experimente mit verschiedenen Auf-arbeitungszeiten	16
2.2.3.2.	Experimente mit verschiedenen Narkosezeiten	16
2.2.3.3.	Experimente mit verschiedenen Spezies	17
2.2.3.4.	Korrelation mit dem Narkosezustand	17
2.2.3.5.	Untersuchungen in verschiedenen Hirn-strukturen	18
2.2.3.6.	Untersuchung lipophiler Pharmaka	18
2.2.4.	Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattenhirn	19
2.2.4.1.	Präparat	19
2.2.4.2.	Apparatur	19
2.2.4.3.	Perfusionsmedium	21
2.2.4.4.	Elektroenzephalogramm	22
2.2.4.5.	Perfusionsversuche	23

Seite

2.2.5. Bestimmung der Hexokinaseaktivität und Auswertung 23

2.3. Anzüchtung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Zellen des Harding-Passey-Melanoms 25

2.3.1. Ehrlich-Ascites-Zellen 25

2.3.1.1. Zellen 25

2.3.1.2. In vivo Ehrlich-Ascites-Zellen 26

2.3.1.3. In vitro Ehrlich-Ascites-Zellen 26

2.3.2. Harding-Passey-Melanomzellen 27

2.3.2.1. Zellen 27

2.3.2.2. In vivo Harding-Passey-Melanomzellen 28

2.3.2.3. In vitro Harding-Passey-Melanomzellen 29

2.3.3. Kulturmedien und Kulturflaschen 30

2.4. Verteilung der intrazellulären Hexokinaseaktivität in Ehrlich-Ascites-Zellen und Harding-Passey-Melanomzellen 32

2.4.1. Untersuchung am Harding-Passey-Melanom in vivo 32

2.4.2. Untersuchung an Ehrlich-Ascites-Zellen in vivo 32

2.4.3. Untersuchungen mit in vitro gezüchteten Zellen 33

2.4.3.1. Experimente an Ehrlich-Ascites-Zellen in vitro 33

2.4.3.2. Experimente an Harding-Passey-Melanomzellen in vitro 34

2.5. Untersuchung von Desoxyribonucleinsäure- und Proteinsynthese 35

Seite

2.5.1. Bestimmung des Proteingehaltes 35

2.5.2. Bestimmung von DNS- und Proteinsynthese mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen 36

2.5.2.1. Konzentration der radioaktiven Substanzen im Kulturmedium 36

2.5.2.2. Aufarbeitung der Kulturen 37

2.5.2.3. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität 37

2.6. Statistische Auswertung 38

3. ERGEBNISSE 39

3.1. Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn 39

3.1.1. Verteilung in vivo 39

3.1.2. Verteilung nach verschiedenen Präparationszeiten in vivo und in vitro 44

3.1.3. Korrelation mit dem Narkosezustand 51

3.1.4. Dosisabhängigkeit im isoliert perfundierten Rattenhirn 57

3.1.5. Verteilung in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratte 62

3.2. Einfluß lipophiler Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Hirnrinde 64

3.3. Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Tumorzellen 68

3.3.1. Verteilung in Ehrlich-Ascites-Zellen in vivo und in vitro 68

Seite

3.3.2. Verteilung in Harding-Passey-Melanomgewebe und Harding-Passey-Melanomzellen in vitro 71

3.3.3. Dosisabhängiger Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität und auf die DNS- und Proteinsynthese in Harding-Passey-Melanomzellen in vitro 74

4. DISKUSSION 82

5. ZUSAMMENFASSUNG 103

6. LITERATUR 106

7. TABELLENANHANG 121

8. LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Mit der Entdeckung der Narkotika und ihrer schnell zunehmenden klinischen Anwendung wuchs das Bemühen um die Aufklärung ihres Wirkungsmechanismus. Seit den ersten Überlegungen von Bernard (1875), die ihn zur Aufstellung einer Kolloidtheorie der Narkose veranlaßten, sind zahlreiche weitere Versuche unternommen worden, eine einheitliche Narkosetheorie aufzustellen. Im Hinblick auf die chemische Verschiedenheit der Narkotika, die im Laufe der Zeit entwickelt wurden, mußte das auf große Schwierigkeiten stoßen. Es ist aber durchaus vorstellbar, daß der Zustand, den wir als Narkose bezeichnen, von verschiedenen Angriffspunkten ausgelöst und über verschiedene neurophysiologische Mechanismen realisiert wird.

Im wesentlichen sind folgende Narkosetheorien postuliert worden:

a) Physikochemische Theorien auf Grund der Lipoidlöslichkeit (Meyer, 1899; Overton, 1901; Clements und Wilson, 1962)

b) Physikochemische Theorien auf der Grundlage der Adsorption an Oberflächen (Traube, 1904; Warburg 1921)

c) Biophysikalische Theorien ausgehend von Wechselwirkungen der Narkotika mit Wassermolekülen und Proteinen (Pauling, 1961; Miller, 1961)

d) Biochemische Theorien

Alle diese Theorien vermögen bis heute nur unzureichend die Angriffspunkte der Narkotika einheitlich zu erklären. Im Vordergrund der physikochemischen-biophysikalischen Vorstellungen stehen Änderungen der Zellmembranpermeabilität durch chemisch inerte Substanzen. Die Wirkungsweise reaktionsfähiger Narkotika könnte man dagegen auch in einer Hemmung enzymatischer Prozesse suchen. Aus der Vielzahl biochemischer Theorien stand eine im Vordergrund der Betrachtungen, wonach nämlich Narkotika den Sauerstoffverbrauch von Gewebeschnitten, Gewebehomogenaten, Mitochondrienpräparationen und isolierten Organen (Quastel, 1939; Jalling et al., 1955; 1957; Aldridge und Parker, 1960; Scholz et al., 1966) und ferner den Elektronen- und Energietransport der Atmungskette hemmen (Brody und Bain, 1951; 1954; Bain, 1952; Brody, 1955; Desci, 1957; Hunter et al., 1959; Aldridge, 1962; Chance und Hollunger, 1963; Chance, 1965; Hansch und Anderson, 1967).

Spätere Untersuchungen zeigten, daß die Hypothese der Störung der Atmungskette nicht zutreffen kann. Während es bei einer Hemmung der Atmungskette zwangsläufig zu einer Reduktion der Energiereserven und zu einer Zunahme der Laktatkonzentration im Gehirn führen müßte, kommt es unter Narkotikagabe eher zu einer Anhäufung energiereicher Substrate.

In der Literatur wurde bereits vielfach über eine Hemmung des cerebralen Energiestoffwechsels in der Narkose berichtet (Lowry et al., 1964; Mayman et al., 1964; Gey et al., 1965; Brunner et al., 1971; Biebuyck und Hawkins, 1972; Smith und

Wollman, 1972; Strang und Bachelard, 1973; Husain und Paradise, 1973; Nilsson und Siesjö, 1974; Hein et al., 1975; Krieglstein und Stock, 1975a; Bielicki und Krieglstein, 1976;). Auffällig ist vor allem der konstant nachweisbare Anstieg der Glucosekonzentrationen (Mayman et al., 1964; Gatfield et al., 1966; Lowry, 1966; Brunner et al., 1971; Passonneau et al., 1971; Biebuyck und Hawkins, 1972; Krieglstein et al., 1972a; Drewes und Gilboe, 1973; Krieglstein und Stock, 1973; Dedrick et al., 1975; Hein et al., 1975; Krieglstein und Stock, 1975a), was auf einen Angriff im oberen Bereich der Glykolyse hindeutet.

Die Schlüsselenzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase sind daher von besonderem Interesse. Verschiedene Autoren (Lowry und Passonneau, 1964; Gatfield et al., 1966; Nilsson und Siesjö, 1974; Carlsson et al., 1975) postulieren eine Beeinflussung der Phosphofruktokinase als eine Ursache des verlangsamten glykolytischen Flusses, da sie eine Zunahme der cerebralen Konzentration von Glucose-6-phosphat fanden. Andere Autoren (Gey et al., 1965; Biebuyck und Hawkins, 1972; Krieglstein und Stock, 1973; Dedrick et al., 1975; Hein et al., 1975; Bielicki und Krieglstein, 1976) konnten aber zeigen, daß unter Narkotikaeinwirkung neben einer Erhöhung des Glukosespiegels der Glukose-6-phosphat-Gehalt erniedrigt wird, was auf eine Beeinflussung der Hexokinase hindeuten würde. Allerdings ist eine direkte Hemmung der Hexokinase durch chemisch so verschiedenartige Narkosemittel kaum vorstellbar und konnte bisher auch in vitro nicht nachgewiesen werden.

Ein neuer Denkansatz ergab sich aber aus Untersuchungen über die intrazelluläre Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität (Crane und Sols, 1953; Abood et al., 1959; Johnson, 1960; Brunngraber und Abood, 1960; Rose und Warms, 1970; Craven und Basford, 1969; Kropp und Wilson, 1970). Es ist bekannt, daß dieses Enzym im Gehirn in drei verschiedenen Formen vorliegt. Man kann eine latente, eine reversibel an die äußere Mitochondrienmembran gebundene und eine im Hyaloplasma gelöste Hexokinase unterscheiden. Damit bildet die Hexokinase eine Ausnahme unter den cerebralen Glykolyseenzymen, die sonst fast ausschließlich im Zytosol gelöst vorliegen (Johnson, 1960; McIlwain und Bachelard, 1971). Die für den Zellstoffwechsel unmittelbar verfügbare Aktivität ist etwa im Verhältnis 4:1 auf die Mitochondrien und das Hyaloplasma verteilt (Johnson, 1960; Knull et al., 1973; Bielicki und Krieglstein, 1977a,b). Dabei liegen die beiden zuletzt genannten Formen offenbar im Gleichgewicht vor, welches durch bestimmte physiologische Substrate des Energiestoffwechsels reguliert werden kann (Rose und Warms, 1967; Wilson, 1968; Knull et al., 1973; 1974), wie z.B. Glukose-6-phosphat, ATP und Phosphat. Im Vergleich zur gelösten Enzymform stellt die reversibel an die äußere Mitochondrienmembran gebundene Hexokinase das aktivere Kompartiment dar; sie hat eine kleinere Michaelis-Konstante für ATP (Fromm und Zewe, 1962; Copley und Fromm, 1967; Thompson und Bachelard, 1970) und eine höhere Inhibitorkonstante für Glukose-6-phosphat (Karpatkin, 1967; Newsholme et al., 1968; Wilson, 1968; Tuttle und

Wilson, 1970; Knull et al., 1974).

Wilson (1968), Moore und Jöbsis (1970), Hochman und Sacktor (1973) postulierten, daß es sich bei dem reversiblen Austausch der Hexokinaseaktivität zwischen äußerer Mitochondrienmembran und Zytosol um einen dynamischen Regulationsprozeß der Enzymaktivität handelt.

Es stellt sich die Frage, ob Narkotika direkt oder indirekt in dieses intrazelluläre Verteilungsgleichgewicht der Hexokinase eingreifen können. In vorausgehenden Untersuchungen (Krieglstein und Bielicki, 1976; Bielicki und Krieglstein, 1977a,b) konnte ein derartiger Eingriff verschiedener Narkosemittel gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwieweit diese Veränderungen tatsächlich mit dem Narkosezustand korrelieren. Dazu wurden zuerst einige methodische Untersuchungen mit dem Injektionsnarkotikum Thiopental vorgenommen. Da es galt, für die weiterführenden Versuche gleiche Voraussetzungen zu schaffen, standen die Aufarbeitungsbedingungen im Vordergrund. Grundsätzlich wurden die Methoden verwendet, wie sie von Knull et al. (1973) bzw. Bielicki und Krieglstein (1977a,b) beschrieben worden sind.

Ausgehend von den Experimenten an Ratten (Bielicki, 1977) sollte geprüft werden, ob in Thiopental-Narkose eine ähnliche Verschiebung des Verteilungsgleichgewichtes der Hexokinaseaktivität an Gehirnen von Mäusen zu beobachten war. Beim Experimentieren mit Mäusen stellte sich heraus, daß das Gehirn in wesentlich geringeren Präparationszeiten

aufgearbeitet werden konnte. Daher lag der Schwerpunkt der ersten Untersuchungen bei dem Bemühen, die Aufarbeitungszeiten zu verkürzen und festzustellen, inwieweit ein Einfluß auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität bestand. Da sich die Aufarbeitungszeiten nicht beliebig verkürzen ließen, wurden einige Experimente an einer isolierten mitochondrialen Hexokinasefraktion in vitro durchgeführt. Die zeitliche Abhängigkeit der Thiopentaleffekte sollte sowohl in vivo als auch in vitro geprüft werden. Da in der Thiopental-Narkose nach 30 Minuten tatsächlich eine Verschiebung in der Verteilung der intrazellulären Hexokinaseaktivität zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob diese Effekte nicht auch schon nach wesentlich kürzeren Narkosezeiten auftreten können. Da das Narkosemittel Thiopental die Tiere schon nach kürzester Zeit in eine tiefe Narkose versetzt, wurden die Gehirne 5 Minuten nach Injektion aufgearbeitet.

In weiteren Experimenten sollte überprüft werden, ob sich die bei kurzen Narkosezeiten gewonnenen Ergebnisse auch bei anderen Tieren (Ratten und Meerschweinchen) bestätigen. Daraus ergab sich die Frage, ob eine zeitliche Korrelation zwischen Narkosezustand und Hexokinaseverteilung bestand. Daher wurden die Messungen über alle Narkosestadien hinweg durchgeführt (vom Exzitationsstadium über die tiefe Narkose bis hin zur Aufwachphase), und die Hexokinaseaktivitätsverteilung bestimmt.

Bielicki und Krieglstein (1977a) konnten in vitro eine dosisabhängige Beeinflussung der intrazellulären Hexokinaseverteilung durch Thiopental an Hirnhomogenaten nachweisen. In Versuchen in vivo war die Abhängigkeit des Effekts von der Thiopentaldosis nicht besonders ausgeprägt. Um die Dosisabhängigkeit trotzdem unter Verhältnissen, die denen in vivo vergleichbar sind, überprüfen zu können, wurde das Modell des isoliert perfundierten Rattenhirns benutzt (Andjus et al., 1967; Fleck et al., 1972; Krieglstein und Stock, 1974). Es bot sich hier die Möglichkeit, unabhängig vom Barbituratblutspiegel die Narkotikumdosis auch über die in vivo erreichbaren Werte zu erhöhen und periphere Wirkungen auf die Hexokinaseverteilung auszuschließen. Es wurden Thiopentalkonzentrationen von 0,05 mM - 0,8 mM im Perfusionsmedium verwendet, die Versuche unter EEG-Kontrolle durchgeführt und die Beeinflussung der cerebralen intrazellulären Hexokinaseverteilung untersucht.

Wie einige Autoren berichten (Bennett et al., 1962; Bigl et al., 1971), liegen in verschiedenen Hirnregionen unterschiedliche Gesamthexokinaseaktivitäten bei annähernd gleichen Aktivitäten der löslichen Hexokinase vor. Da für weiterführende Untersuchungen besonders der Cortex interessant schien, wurde der Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität hier und in einigen anderen Hirnarealen der Ratte geprüft.

Angesichts der mit Thiopental durchgeführten Experimente erschien es interessant, auch die Wirkung anderer narkotisch

wirksamer Pharmaka auf die intrazelluläre Aktivitätsverteilung der cerebralen Hexokinase zu untersuchen. Zum einen sollten reine Narkotika verwendet werden, zum anderen aber auch stark lipophile Pharmaka, um Effekte allein als Folge der Lipophilie eines Stoffes auszuschließen. Die Untersuchungen wurden in vivo an der Hirnrinde der Ratte vorgenommen und der Einfluß der Pharmaka auf die Fähigkeit hin geprüft, die an Mitochondrien gebundene Hexokinase direkt zu beeinflussen.

Bennett et al. (1978) und Bigl et al. (1971) vermuten, daß in Gliazellen vermehrt lösliche Hexokinase, in neuronalem Gewebe mitochondrial gebundene Hexokinase vorliegt. Um hier klare Aussagen treffen zu können, inwieweit Unterschiede im Hexokinaseverteilungsmuster vorliegen, bietet sich die Zellkultur als Möglichkeit an, differenzierte Untersuchungen vorzunehmen. Die Versuche an Pflanzenzellen oder an Zellkulturen sind sicher nur bedingt auf die Situation in vivo übertragbar. Bei Verwendung der Methoden der in-vitro-Züchtung von Zellen und Geweben lassen sich möglicherweise neue Ansatzpunkte zum Verständnis der Narkotikawirkung auf den Zellstoffwechsel herausarbeiten.

In ersten Experimenten wurde die Verteilung der Hexokinaseaktivität am Tumorgewebe des Harding-Passey-Melanoms (1930) geprüft. Für die anschließenden Untersuchungen standen Mäuse zur Verfügung, denen Ehrlich-Ascites-Tumorzellen appliziert worden waren. An diesen in vivo gezüchteten Ascites-Zellen wurde zum einen die Hexokinaseaktivitäts-

verteilung geprüft, zum anderen sollten die Zellen dazu benutzt werden, den Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität zu prüfen. Nach diesen orientierenden Experimenten in vivo wurden weiterführende Untersuchungen an in vitro gezüchteten Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Harding-Passey-Melanomzellen vorgenommen.

Schon vor hundert Jahren hatte Bernard (1878) auf den hemmenden Effekt von Narkotika auf die Zellteilung hingewiesen; 1944 zeigte dann Östergreen, daß nahezu alle Pharmaka mit Narkosewirkung Mitosen blockieren können. Um auszuschließen, daß bei den vorliegenden Untersuchungen zytostatische Effekte während der Inkubationszeit eine Rolle spielen, sollten unter Thiopental dosisabhängig die DNS- und Proteinsynthese verfolgt werden.

Beide Tumorzellarten sollten daraufhin untersucht werden, inwieweit Thiopental intrazellulär einen Einfluß auf das Gleichgewicht zwischen mitochondrial gebundener und im Zytosol gelöster Hexokinaseaktivität ausübt. Genauere Untersuchungen folgten dann an HPM-Zellen; an ihnen sollte dosisabhängig der Effekt von Thiopental auf das Gleichgewicht der Hexokinaseaktivität geprüft werden.

Insgesamt sollten die vorgenommenen Untersuchungen dazu beitragen, den Eingriff von Narkotika in die intrazelluläre Hexokinaseverteilung näher zu analysieren.

2. METHODIK

2.1. Material

Die Untersuchungen wurden an männlichen Sprague-Dawley-Ratten (200 - 250 g), NMRI-Mäusen (25 - 35 g) und Meerschweinchen (260 - 320 g) durchgeführt. Bis zum Beginn des Experiments hatten die Tiere freien Zutritt zu Standard-Futter (Altromin®) und Leitungswasser.

Außerdem wurden in vivo und in vitro gezüchtete Ehrlich's hyperdiploide Ascites Tumorzellen sowie Zellen des Harding-Passey-Melanoms verwendet.

Bei den Untersuchungen wurden folgende Substanzen benutzt:

Amphetamin [(±)-α-Methylphenethylamin-sulfat; Merck, Darmstadt],

Chlorpromazin [2-Chlor-10-[3-(dimethylamino)propyl]-phenothiazin-hydrochlorid, Megaphen® ; Bayer, Leverkusen],

Diazepam [7-Chlor-1-methyl-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-on, Valium® ; Roche, Basel],

Ethanol

Haloperidolum [4 [4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxypiperidyl]-4'-fluorbutyrophenon, Haloperidol® ; Janssen, Düsseldorf],

Lachgas,

R(-)-1-Methyl-5-phenyl-5-propyl-barbitursäure,

S(+)-1-Methyl-5-phenyl-5-propyl-barbitursäure,

Perphenazin [2-Chlor-10-[3-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] propyl] phenothiazin, Decentan®; Merck, Darmstadt],

Phenylbutazon [4-Butyl-1,2-diphenylpyrazolidin-3,5-dion; Ciba-Geigy, Basel],

Phenytoin [5,5-Diphenylhydantoin; Nordmark, Hamburg],

Propanidid [Propyl-4-(diethylaminocarbonyl)-3-methoxy-phenylacetat, Epontol®; Bayer, Leverkusen],

Rinderserumalbumin [trocken rein + reinst; Behringwerke, Marburg],

Thiopental [5-Ethyl-5-(1-methyl-butyl)-2-thiobarbitursäure, Trapanal®; Byk Gulden, Konstanz].

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien als pA-Substanzen von Merck (Darmstadt) und Radiochemikalien von Amersham-Buchler (Braunschweig) bezogen.

Die folgenden Enzyme, Coenzyme, Substrate, sterile Medien und Seren bzw. Hilfsstoffe stammten von Boehringer (Mannheim):

Adenosin-5'-triphosphat (ATP),

Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP),

Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase, G6P-DH aus Hefe (D-Glukose-6-phosphat: NADP 1-Oxidoreductase, EC 1.1.49),

Basal Medium Eagle mit Earle's Salzen (BME),

L-Glutamin, Streptomycin-Penicillin,

Phosphate-buffered-saline nach Dulbecco ohne Ca^{++} und Mg^{++} (PBS),

Fetales Kälberserum.

Von Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A. stammten:

Hepes [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure],

α-Thioglycerol.

Von der Fa. Carl Roth (Karlsruhe) stammte Rotiszint 22.

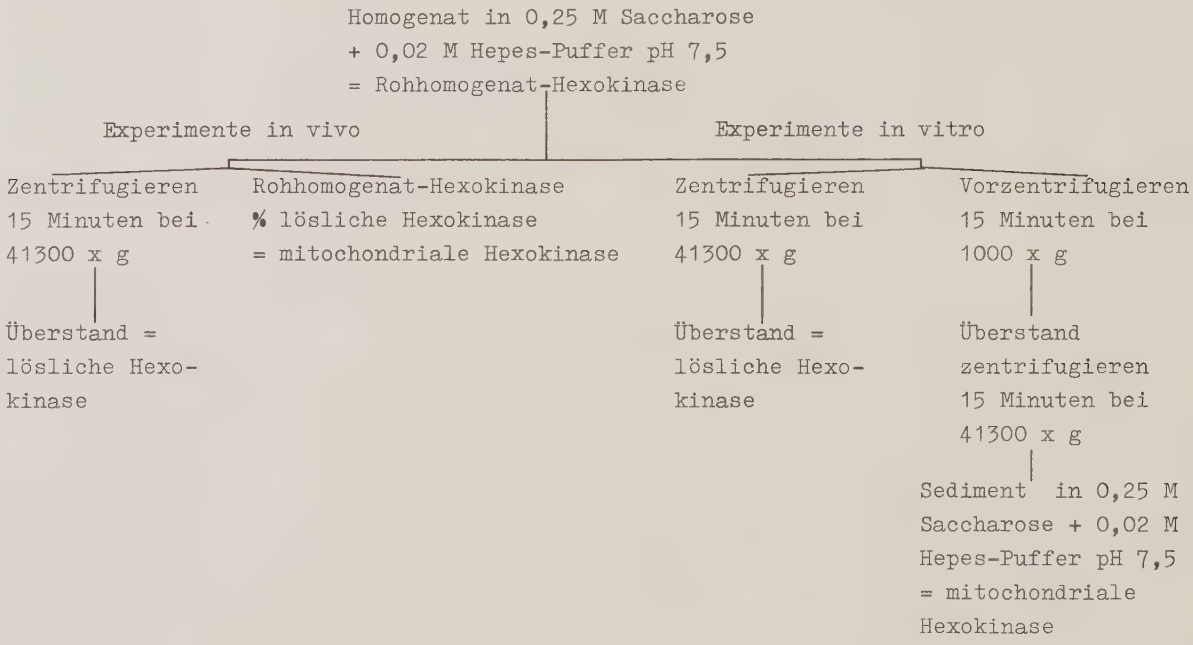
Doppelt destilliertes Wasser wurde zum Ansetzen von Lösungen verwendet.

2.2. Untersuchung der cerebralen Hexokinase

2.2.1. Darstellung der Hirnhexokinase

Die Tiere wurden durch Genickschlag getötet, das Gehirn möglichst rasch aus der Schädelkapsel herauspräpariert und im vorgekühlten Potter-Elvehjem Homogenisator (Braun, Melsungen) gewogen. Das Gehirngewebe wurde dann mit der zehnfachen Menge einer eiskalten gepufferten Saccharoselösung (0,25 M Saccharose + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5) versetzt und im Eisbad homogenisiert. Das Homogenisieren wurde standardisiert, indem jeweils 20 Hin- und Herbewegungen mit dem Teflonpistill des Homogenisators durchgeführt wurden. Die erhaltene Suspension wurde als Rohhomogenat bezeichnet, die in dieser Fraktion gemessene Aktivität als Rohhomogenat-Hexokinaseaktivität. Durch Zentrifugieren des Rohhomogenats für 15 Minuten bei 41300 x g (gekühlte Hochgeschwindigkeitszentrifuge Modell B 20A, Damon/IEC, Rotor Nr. 870; Biotronik, Frankfurt) wurde die sich im Überstand befindende gelöste Hexokinase abgetrennt (lösliche Fraktion). Die an Mitochondrien gebundene Hexokinase (mitochondriale Hexokinase) wurde aus dem Rohhomogenat isoliert, indem dieses 15 Minuten bei 1000 x g (Minifuge, Heraeus-Christ, Osterode) vorzentrifugiert wurde, der Überstand dann 15 Minuten bei 41300 x g weiterzentrifugiert und das erhaltene Sediment in der sechsfachen Menge Saccharoselösung (0,25 M Saccharose + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5), bezogen auf das Gewicht des ursprünglichen Gehirngewebes, resuspendiert wurde (mitochondriale Fraktion). Alle Zentrifugationen wurden bei 0 ^{o}C durchgeführt.

Abbildung 1 : Fraktionierung des Gehirnhomogenates zur Untersuchung der Hexokinaseaktivität in vitro und in vivo



Hepes = 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure.

Die Fraktionierungsbedingungen der cerebralen Hexokinase sind nochmals in Abbildung 1 aufgeführt und stimmen mit denen weitgehend überein, die von Wilson (1967) und Knull et al. (1973) angegeben wurden.

2.2.2. Verteilung der intrazellulären Hexokinase-aktivität in vitro

Zur Prüfung der Thiopentaleffekte auf die an Mitochondrien gebundene Hexokinase wurde die mitochondriale Fraktion, gewonnen aus Gehirnen unbehandelter Mäuse, verschieden lange Zeiten mit Thiopental bei 30 °C inkubiert. Thiopental wurde in 0,25 M Saccharoselösung gelöst, die Konzentration in der Inkubationssuspension betrug 0,5 mM. In den Kontrollversuchen wurde die mitochondriale Hexokinasefraktion nur mit einer aliquoten Menge der 0,25 M Saccharoselösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension bei 0 °C und 41300 x g 15 Minuten zentrifugiert und im Überstand die Aktivität der gelösten Hexokinase bestimmt. Mit Thiopental wurde zeitabhängig der Einfluß auf die mitochondriale Fraktion untersucht, wobei verschiedene Zeitpunkte im Inkubationszeitraum zwischen null und 30 Minuten ausgewählt wurden.

2.2.3. Verteilung der intrazellulären Hexokinase-aktivität in vivo

2.2.3.1. Experimente mit verschiedenen Aufarbeitungszeiten

Zur Untersuchung der Effekte von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn während verschiedener Aufarbeitungszeiten wurden Mäuse nach einer Narkosezeit von 30 Minuten durch cerebrale Dislokation getötet. Die Aufarbeitungszeiten betrugen 45, 60, 90 und 120 Sekunden. Als Präparationszeiten wurden die Zeitspannen vom Töten der Tiere bis zum Beginn des Homogenisierens der Gehirne festgelegt. Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen intraperitoneal verabreicht, die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung.

2.2.3.2. Experimente mit verschiedenen Narkosezeiten

Zur Untersuchung des Einflusses von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn während verschiedener Narkosezeiten wurden Mäuse nach einer Narkosezeit von 30 Minuten bzw. von 5 Minuten und einer Präparationszeit von 120 Sekunden aufgearbeitet. Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen intraperitoneal verabreicht, die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung.

2.2.3.3. Experimente mit verschiedenen Spezies

Zur Untersuchung der Effekte von Thiopental auf die Aktivitätsverteilung der Hexokinase im Gehirn von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen wurden die Tiere nach einer Narkosezeit von 5 Minuten getötet. Die Präparationszeiten betrugen 60 Sekunden bei Mäusen, 90 Sekunden bei Ratten und 180 Sekunden bei Meerschweinchen. Thiopental wurde in einer Dosierung verwendet, die eine tiefe Narkose verursachte; Mäuse erhielten 100 mg/kg, Ratten 80 mg/kg und Meerschweinchen 32 mg/kg Thiopental intraperitoneal, den Kontrolltieren wurde physiologische Kochsalzlösung injiziert.

2.2.3.4. Korrelation mit dem Narkosezustand

Zur Untersuchung der Korrelation der Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn mit dem Narkosezustand wurden Mäuse nach verschiedenen Narkosezeiten getötet. Vor cerebraler Dislokation wurden der Stellreflex und die Schmerzreaktion geprüft und jeweils als vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) gekennzeichnet. 3 Minuten nach Thiopentalinjektion befanden sich die Tiere in Narkose, 3 Stunden nach der Injektion waren sie noch benommen, 5 Stunden nach der Thiopentalgabe verhielten sich die Tiere wieder normal. Die Präparationszeiten betrugen 90 Sekunden. Thiopental (100 mg/kg) wurde den Mäusen intraperitoneal verabreicht, die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung.

2.2.3.5. Untersuchungen in verschiedenen Hirnstrukturen

Zur Untersuchung der Effekte von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratte wurde die Sektionsmethode nach Glowinski und Iversen (1966) durchgeführt. Die Aufarbeitung der folgenden Areale (Cortex, Cerebellum, Medulla und Pons, Rest des Gehirns nach Sektion der übrigen Areale) erfolgte nach einer Narkosezeit von 10 Minuten, die Aufarbeitung wurde für alle Hirnregionen gleich gewählt und betrug 180 Sekunden. Ratten wurde Thiopental (80 mg/kg) intraperitoneal appliziert, die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung.

2.2.3.6. Untersuchung lipophiler Pharmaka

Zur Untersuchung der Effekte lipophiler Pharmaka auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität im Cortex wurden Ratten mit folgenden Pharmaka behandelt:

Diazepam	(25 mg/kg)
Ethanol	(5 g/kg)
Lachgas	(80 %)
Phenytoin	(300 mg/kg)
Propanidid	(0,5 g/kg)
R(-)/S(+)-Methyl-phenyl-propyl-barbitursäure	(100 mg/kg)
Amphetamin	(25 mg/kg)
Chlorpromazin	(25 mg/kg)
Haloperidol	(20 mg/kg)
Perphenazin	(10 mg/kg)

Die Tiere wurden 30 Minuten nach Applikation der Pharmaka aufgearbeitet, bei der Propanididbehandlung erfolgte die Aufarbeitung, nachdem sich die Tiere in Narkose befanden. Die Präparationszeit betrug 180 Sekunden. Vor dem Töten wurde der Stellreflex und die Schmerzreaktion geprüft und jeweils als vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) gekennzeichnet. Die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal.

Bei allen Experimenten in vivo wurde die Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat und nach der Rohhomogenatfraktionierung in der löslichen Fraktion gemessen.

2.2.4. Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattenhirn

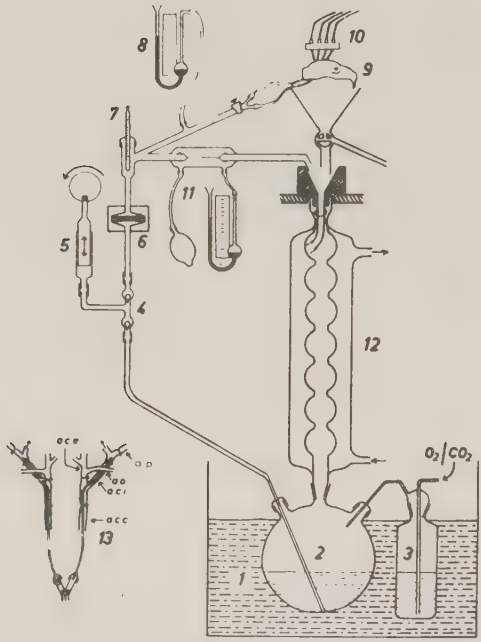
2.2.4.1. Präparat

Das Präparat des isoliert perfundierten Rattenhirns nach Andjus et al. (1967) bestand aus dem vom Unterkiefer befreiten Schädel mit Inhalt und den extrakranialen Muskelresten sowie den drei bis vier oberen Halswirbeln.

2.2.4.2. Apparatur

Als Apparatur zur Perfusion des isolierten Rattenhirns wurde die von Fleck et al. (1972) beschriebene Apparatur I (Abbildung 2) verwendet. Ihre Grundbestandteile sind ein Pumpsystem, das die Herzfunktion, und ein Oxygenator, der die Lungenfunktion übernimmt. Sie werden durch Filter und

Abbildung 2 : Perfusionsapparatur I (Fleck et al., 1972)



1	Wasserbad
2	Vorratsgefäß für das Perfusionsmedium
3	Waschflasche für Carbogen mit physiologischer Kochsalzlösung
4 u. 5	Pumpe mit Ventil
6	Filter
7	Thermometer
8	Manometer zur Kontrolle des Perfusionsdrucks
9	Rattenschädel
10	Elektroden, die auf dem Schädeldach (Parietalregion) aufsitzen
11	Starlingwiderstand mit Manometer
12	Oxygenator
13	Schematische Darstellung der Gefäße mit eingebundenen Kathetern: a.c.c. = Arteria carotis communis, a.c.i. = Arteria carotis interna, a.c.e. = Arteria carotis externa, a.o. = Arteria occipitalis, a.p. = Arteria pterygopalatina

Ventile ergänzt. Die Apparatur besteht weitgehend aus Glas. Die Schlauchverbindungen sind auf das notwendigste beschränkt.

Das Gehirn wurde beiderseits über die Arteria carotis interna mit künstlichem Blut (Perfusionsmedium) versorgt. Die Perfusionen erfolgten rezirkulierend, d.h. das aus den bei der Präparation angeschnittenen Venen abtropfende Perfusionsmedium wurde über einen Trichter in die Perfusionsapparatur zurückgeleitet. Die Durchflußgeschwindigkeit des Perfusionsmediums durch das isolierte Gehirn betrug ca. 1,5 - 3 ml/Minute, der angelegte arterielle Druck, registriert über einen Druckwandler (Statham P 23 Db, Statham Medical Instruments Inc., Heto Rey, Puerto Rico; Elektromanometer MA: Hellige, Freiburg i. Br.), betrug 110 mm Hg.

2.2.4.3. Perfusionsmedium

Für einen Perfusionsversuch wurden 100 ml Perfusionsmedium vorbereitet. Sie enthielten 35 ml gepackte Rindererythrozyten, 14 mM Glukose, 2 g Rinderserumalbumin rein und Krebs-Henseleit-Lösung ad 100 ml.

Die Erythrozyten wurden aus Rinderblut, das nicht älter als 60 Stunden war, gewonnen. Das Blut wurde im Schlachthof mit isotoner Natriumzitrat-Lösung, die 55 mM (10 g/l) Glukose enthielt, verdünnt und bei 5 ^{o}C gelagert. Zur Gewinnung der Erythrozyten wurden das Rinder-Zitratblut durch Zentrifugieren vom Plasma getrennt (2000 U/min; Zentrifuge Modell 1200,

Gesellschaft für elektrophysikalischen Apparatebau, Brandau/Odw.), zweimal mit 1 % Kochsalzlösung und anschließend mit Krebs-Henseleit-Lösung (Krebs und Henseleit, 1932) gewaschen. Die sedimentierten Erythrozyten wurden zur Bereitung des Perfusionsmediums verwendet.

Zur Untersuchung der Effekte von Thiopental auf das isolierte Gehirn wurde das Narkotikum im Perfusionsmedium gelöst. Die Konzentrationen betrugen 0,05 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, und 0,8 mM. Die Kontrollversuche enthielten keinen Barbituratzusatz. Der mit der Mikrohämatokritzentrifuge (Heraeus-Christ, Osterode) bestimmte Hämatokrit lag dabei zwischen 26 % und 32 %. Der pH des vor der Perfusion ca. 30 Minuten bei 37 °C in der Apparatur zirkulierenden und mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begasten Perfusionsmediums betrug pH 7,4.

2.2.4.4. Elektroenzaphalogramm

Während der Perfusionen wurde das Elektroenzephalogramm (EEG) registriert, das bipolar von beiden Hemispheren über der Parietalregion abgeleitet, über ein Oszilloskop beobachtet und mit einem Schreiber aufgezeichnet wurde (EEG-Vorverstärker EE; Kardioskop; Registrierteil; Hellige, Freiburg i. Br.).

2.2.4.5. Perfusionsversuche

Der während der Perfusion gewählte arterielle Druck lag in der Größenordnung von 110 bis 125 mm Hg, wobei die Blutdruckamplitude 5 - 10 mm Hg groß war. Die Durchflußgeschwindigkeit blieb während eines Perfusionsversuchs weitgehend unverändert. Die Perfusionsdauer war auf 30 Minuten festgesetzt und wurde vom Zeitpunkt der Dekapitation gemessen. Die EEG-Ableitungen wurden nach 5, 10, 15, 20, 25 Minuten und zum Ende der Perfusionszeit aufgezeichnet. Es wurden nur diejenigen Versuche ausgewertet, bei denen die elektrische Aktivität des isolierten Gehirns bis zur Entnahme aus dem Schädel gleichbleibend war. Nach 30 Minuten wurde der Perfusionskreislauf unterbrochen, das Gehirn entnommen und gewogen. Die Zeitspanne bis zur Aufarbeitung dauerte maximal 2 Minuten. Sie wurde möglichst konstant gehalten. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. angegeben.

2.2.5. Bestimmung der Hexokinaseaktivität und Auswertung

Die Hexokinaseaktivität wurde nach einer modifizierten Methode von Hernandez und Crane (1966), wie von Knull et al. (1973) beschrieben, durchgeführt.

Ein Meßansatz in der Küvette enthielt im Testvolumen von 1 ml: 3,3 mM Glukose, 6,7 mM ATP, 6,7 mM $MgCl_2$, 40 mM Hepes-Puffer pH 7,5, 10 mM α-Thioglycerol, 0,64 mM NADP und 1 U Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase. Die Reaktion wurde mit verdünntem Hexokinasepräparat gestartet.

Das Prinzip der Messung beruht auf der Tatsache, daß Licht durch die reduzierte Form von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) bei 340 nm mit einem Maximum absorbiert wird. Die oxidierte Form (NADP) zeigt zwischen 300 - 400 nm keine Absorption. Durch Registrierung und Extinktionszunahme kann die Dehydrogenasereaktion, bei der NADP reduziert wird, gemessen werden. Aus der Extinktionsdifferenz, die sich während der Reaktion ergibt, kann auf die Konzentration des umgesetzten Substrates geschlossen werden.

Die Messung der NADPH-Bildung wurde bei 30 ^{o}C und 340 nm mit einem Zeiss-Photometer PM 6 (Zeiss, Oberkochen) und einem angeschlossenen Rikadenki Schreiber (Hellige, Freiburg i. Br.) verfolgt. Die Extinktionszunahmerate wurde alle 30 Sekunden registriert und blieb über ca. 15 Minuten konstant.

Ein Kontrollansatz ohne Substrat und Kopplungsenzym (Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase) wurde mitgeführt, zeigte aber eine sehr niedrige Extinktionsabnahmerate und konnte bei der Berechnung vernachlässigt werden.

Auswertung

Mit Hilfe der Extinktionsdifferenz zwischen Anfang und Ende der enzymatischen Reaktion kann die Konzentration und damit auch die Menge des umgesetzten Substrates bestimmt werden. Zur Berechnung der enzymoptisch bestimmten

Substanz wurde für NADP ein mikromolarer Extinktionskoeffizient von 6,22 $cm^2/\mu Mol$ (bei 340 nm) eingesetzt (Bergmeyer, 1970).

$$A = \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot F \cdot \frac{\Delta E}{min} \quad \left[U/g\right]$$

A = Aktivität
V = Meßvolumen (Gesamtvolumen)
Δ E = Extinktionsdifferenz
ε = mikromolarer Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{340}=6,22\ cm^2/\mu Mo$
d = Schichtdicke der Küvette in cm
v = Probevolumen
F = Verdünnungsfaktor

Die Enzymaktivität wurde in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) bzw. in U/mg Protein angegeben (U = 1 Einheit des Enzyms als 1 µMol NADPH/min).

2.3. Anzüchtung von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Zellen des Harding-Passey-Melanoms

2.3.1. Ehrlich-Ascites-Zellen

2.3.1.1. Zellen

Für die Untersuchungen wurden Ehrlich's hyperdiploide Ascites-Tumorzellen (ED-0,15-Zellen) verwendet. Diese Tumorzellen weisen charakteristische Marker-Chromosomen, sogenannte

A- und B-Chromosomen (Bayreuther, 1952; Melander, 1963; Schachtschabel et al., 1969a,b) auf.

2.3.1.2. In vivo Ehrlich-Ascites-Zellen

NMRI-Mäusen (Fa. Ivanovas, Kisslegg) wurden 2 x 10^6 Zellen / 0,2 ml intraperitoneal inokultiert. Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Zellen aus der Ascitesflüssigkeit geerntet.

2.3.1.3. In vitro Ehrlich-Ascites-Zellen

Die Zellen wurden von Schachtschabel, 1963 (Schachtschabel, 1967; 1969a) aus der Ascitesflüssigkeit einer CFW-Maus isoliert und seitdem permanent in vitro weitergezüchtet. Die in-vitro-Zellen (Abbildung 3) wuchsen in Monolayer-Kulturen bei 37 ^{o}C, ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Verbrauchtes Nährmedium wurde durch frisches, vorgewärmtes Medium unter sterilen Bedingungen ersetzt. Die zugesetzte Mediummenge richtet sich nach der Anzahl der Zellen pro Kulturflasche; auf 10^6 Zellen entfielen etwa 2 ml Medium. Um eine starke Alkalisierung zu vermeiden, wurden die Kulturen permanent im Inkubator mit 7 % CO_2 begast.

Abbildung 3 : Ehrlich's hyperdiploide Ascites Tumorzellen in Monolayerkultur

2.3.2. Harding-Passey-Melanomzellen

2.3.2.1. Zellen

Das Harding-Passey-Melanom, ein am Ohr einer Maus spontan entstandener melaninbildender Tumor, wurde im Herbst 1925 von dem Pathologen Passey an der Leeds University Medical School in Leeds, England (Harding und Passey, 1930) isoliert. Der Tumor war etwa gerstenkorngroß, in seiner Form gelappt und dunkel pigmentiert. Die histologische Untersuchung zeigte keine Infiltration in den Oberknorpel und die Epidermis.

Harding und Passey benutzten diesen Tumor zur Transplantation auf braune Mäuse, die aus verschiedenen Stämmen gekreuzt wurden. Später gelang es, diese Tumore auch auf weißen C 57 - Bl -, DBA-, C3H- und Agouti Mäusen weiterzuzüchten (Sugiura, 1948).

Die Angehrate bei subkutaner Implantation betrug ca. 95 % (Sugiura, 1948), wobei sich nach etwa 16 Wochen ein Tumor mit einem mittleren Durchmesser von 5 cm ausgebildet hatte. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumoren meist ulzeriert. Wenige Wochen später starben die Mäuse im allgemeinen an Sepsis oder Ernährungsstörungen.

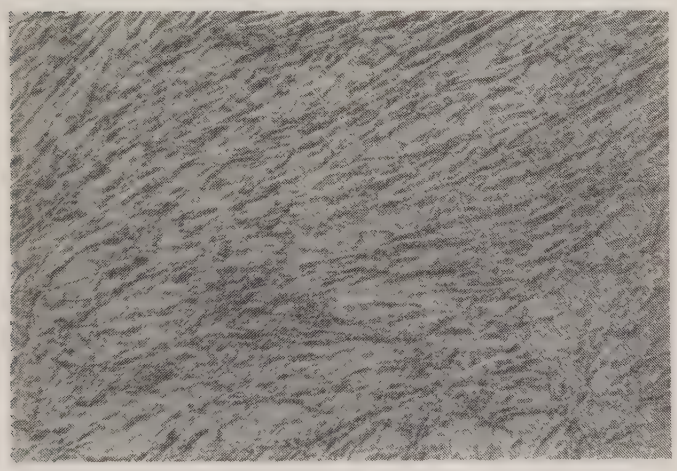
2.3.2.2. In vivo Harding-Passey-Melanomzellen

Für die in-vivo-Züchtung der HPM-Zellen wurden weiße, ca. 30 g schwere NMRI Mäuse (Zucht des Physiolog. Chem. Inst. II, Universität Marburg) verwendet. Pro Tier wurden 0,2 ml Melanomgewebesuspension (1 Teil Gewebe + 1 Teil serumfreies Kulturmedium im Mörser zerrieben) unter Verwendung einer Kanüle subcutan in die hintere rechte Rückenhälfte injiziert. Nach 4 $\pm$ 1 Wochen waren an der Implantationsstelle stecknadelkopfgroße Knötchen tastbar, die dann in den folgenden Monaten bis zu einem Tumorgewicht von 25 - 30 g weiterwuchsen.

2.3.2.3. In vitro Harding-Passey-Melanomzellen

Es wurde die sogenannte HPM 73 Zellinie verwendet, im November 1973 aus einem Mausmelanom von Schachtschabel nach einer früher beschriebenen Methodik (1969a; 1971) isoliert und seitdem permanent in vitro weitergezüchtet. Die in-vitro-Zellen (Abbildung 4) wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Abbildung 4 : Pigmenthaltige Harding-Passey-Melanomzellen in Monolayer-Kultur (HPM-73 Zellen)



Die Zellen, die bei der Einsaat noch in Suspension vorliegen, sinken im Medium ab und haften nach etwa einer Stunde an der Wand der Kulturflaschen. Der Zellrasen ist im allgemeinen nicht einschichtig ("monolayer"), sondern zeigt an

vielen Stellen "Zellaggregate" oder mehrschichtiges Wachstum. Das Nährmedium der HPM 73 Kulturen wird alle 48 Stunden gewechselt. Dazu wird unter sterilen Bedingungen das verbrauchte Medium dekantiert und je nach Zellmenge 5 - 15 ml frisches, auf 37 ^{o}C angewärmtes Kulturmedium zugesetzt.

Bei niedriger Zelleinsaat 1-4 x 10^4 / cm^2 müssen die Kulturen im Inkubator mit 7 % CO_2 begast werden, um ein Alkalisieren (pH 7,6 - 7,8) zu verhindern. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen etwa bei einem pH-Wert von 7,2.

Die Subkultivierung geschieht etwa alle 4 Wochen durch Abschaben des Zellrasens im Nährmedium mit einem Gummiwischer. Die so erhaltene Zellsuspension wird je nach Menge auf 3 - 5 neue Flaschen übertragen.

2.3.3. Kulturmedien

Als Kulturmedien, in dem diese Zellen permanent in vitro gezüchtet wurden, diente Basal Medium Eagle mit Earle's Salz. (BME mit Earle's Salz) (Eagle, 1955 ; Earle, 1943). Dem Flüssigmedium mit $NaHCO_3$ ohne L-Glutamin wurden unter sterilen Bedingungen folgende Lösungen (steril) zugesetzt: L-Glutamin, Streptomycin-Penicillin und Fetales Kälberserum 10 %.

Basalmedium (Eagle) mit Earle's Salz ist folgendermaßen zusammengesetzt:

Tabelle 1 : Zusammensetzung: Basal Medium Eagle mit Earle's Salzen

Aminosäuren	mg/l	Sonstige Substanzen	mg/l
L-Arginin · HCl	21,06	D(+)-Glucose · H_2O	1100,0
L-Cystin · 2 HCl	15,65	Phenolrot, Na	10,6
L-Glutamin	292,30		
L-Histidin · HCl · H_2O	10,50		
L-Isoleucin	26,23	Anorganische Salze	
L-Leucin	26,23		
L-Lysin · HCl	36,53	Earle's Salze	
L-Methionin	7,46	$CaCl_2$ · 2 H_2O	265,0
L-Phenylalanin	16,51	KCl	400,0
L-Threonin	23,82	$MgSO_4$ · 7 H_2O	200,0
L-Tryptophan	4,08	NaCl	6800,0
L-Tyrosin	18,11	$NaHCO_3$	2200,0
L-Valin	23,43	NaH_2PO_4 · H_2O	140,0

Vitamine

D-Biotin	1,0	a)	Streptomycin 0,1 g/l
Ca-D(+)-Pantothenat	1,0		Penicillin 100 000 IU/l
Cholinchlorid	1,0	b)	Fetales Kälberserum 100 ml/l
Folsäure	1,0		
meso-Inosit	2,0		
Nicotinsäureamid	1,0		
Pyridoxal · HCl	1,0		
Riboflavin	0,1		
Thiamin	1,0		

Kulturflaschen:

Es wurden 25 cm^2 bzw. 75 cm^2 Kulturflaschen der Firma Falcon Plastics (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet.

2.4. Verteilung der intrazellulären Hexokinaseaktivität in Ehrlich-Ascites-Zellen und Harding-Passey-Melanomzellen

2.4.1. Untersuchung am Harding-Passey-Melanom in vivo

Eine melanomtragende Maus wurde getötet und ein HP-Melanom von etwa 2,5 g entnommen. Je 0,5 g Gewebe wurde sofort im vorgekühlten Potter-Elvehjem gewogen,mit der zehnfachen Menge einer eiskalten gepufferten Saccharoselösung (0,25 M Saccharose + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5) versetzt und im Eisbad homogenisiert. Die weitere Fraktionierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. angegeben.

2.4.2. Untersuchung an Ehrlich-Ascites-Zellen in vivo

Eine ascitestragende Maus wurde getötet und 2 ml Ascitesflüssigkeit mit 8 ml BME-Medium versetzt. Die Zellen wurden anschließend für 2 Minuten bei 1000 x g abzentrifugiert,in 5 ml BME resuspendiert und erneut 2 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und aliquote Teile 1 Stunde mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Medium bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 1000 x g wurden die Zellen mit eiskaltem Medium bzw. Medium mit Thiopental gewaschen, erneut 2 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, in eiskalter gepufferter Saccharoselösung (0,25 M Saccharose + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5) aufgenommen und im

Eisbad in einem vorgekühlten Potter Elvehjem homogenisiert. Die weitere Fraktionierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. angegeben.

2.4.3. Untersuchungen mit in vitro gezüchteten Zellen

Zu jedem Experiment wurden 16 Kulturen gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt, die durch Subkultivierung aus 3 - 5 Stammkulturen gewonnen wurden. Die Zellen erhielten am Tag nach dem Transferieren und von dann an jeden zweiten Tag frisches Medium. Für alle Untersuchungen wurde Basal Medium Eagle mit Earle's Salzen und 10 % Fetalem Kälberserum verwendet. Vor dem Zusetzen und Inkubieren mit Pharmaka wurde das Medium jeweils erneut gewechselt.

2.4.3.1. Experimente an Ehrlich-Ascites-Zellen in vitro

Thiopental, in wäßriger Lösung, wurde den Kulturen in einer Endkonzentration von 1×10^{-3} im Medium (15 ml) zugesetzt. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem CO_2-Inkubator (B 5060 EK/CO_2; Heraeus Hanau) bei einer CO_2-Konzentration von 7 %. Die Inkubationszeit betrug in allen Experimenten 1 Stunde. Nach Entnahme von 8 ml Medium wurden die Zellen mit einem Gummiwischer abgeschabt, mit dem restlichen Medium in ein Zentrifugenglas dekantiert, mit 2 ml Medium nachgewaschen und 2 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert.

Nach anschließendem Waschen mit Medium bzw. Medium mit Thiopental wurden die Zellen erneut 2 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, in eiskalter gepufferter Saccharoselösung (0,25 M Saccharose + 0,02 M Hepes-Puffer pH 7,5) aufgenommen und in einem vorgekühlten Potter-Elvehjem im Eisbad homogenisiert. Die weitere Fraktionierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1. angegeben.

2.4.3.2. Experimente an Harding-Passey-Melanomzellen in vitro

Thiopental, in wäßriger Lösung, wurde den Kulturen in einer Endkonzentration von 1×10^{-3} M im Medium zugesetzt. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem CO_2-Inkubator bei einer CO_2-Konzentration von 7 %. Die Inkubationszeit betrug in allen Experimenten eine Stunde. Die Aufarbeitung erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 2.4.3.1. und 2.2.1. angegeben.

Zur Prüfung der dosisabhängigen Wirkung von Thiopental wurde den Kulturen Thiopental in Konzentrationen von $3,3 \times 10^{-5}$ M, 1×10^{-4} M und $3,3 \times 10^{-4}$ M im Medium zugesetzt. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei 37 °C und einer CO_2-Konzentration von 7 % im Inkubator. Die Inkubationszeit betrug in allen Experimenten eine Stunde. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben angegeben.

2.5. Untersuchung von Desoxyribonucleinsäure- und Proteinsynthese

2.5.1. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte aus dem Rückstand der Hexokinasefraktionierung und wurde bei allen verwendeten Kulturen durchgeführt.

Zum Lösen des Zentrifugates wurde mit 1 N NaOH 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Von dieser Lösung wurden 0,2 ml zur Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951), in der Modifikation nach Oyama und Eagle (1956), eingesetzt. Bei jeder Bestimmung wurden als Referenz mehrere Albuminkonzentrationen (25, 50, 75, 100, 150, 200 µg/Ansatz) mitgemessen (Rinderserumalbumin, reinst, Behringwerke AG, Marburg).

Die Extinktionsmessung erfolgte 10 - 30 Minuten nach Vermischen des Bestimmungsansatzes. Bei Einhaltung dieser Bedingungen ist eine lineare Beziehung zwischen Farbbildung und Proteinkonzentration (im Bereich zwischen 5 und 200 µg) zu erzielen.

Reagenzien: Lowry A: 20,0 g Na_2CO_3

0,268 g K-Na-Tartrat x 4 H_2O

100 ml 1 N NaOH

ad 1000 ml Aqua bidest.

Lowry B: 0,5 g $CuSO_4$ x 5 H_2O / 100 ml H_2O

Phenolreagenz (Folin):

5 ml Folin Ciocalteau Phenol Reagenz

6 ml Aqua bidest.

2.5.2. Bestimmung von DNS- und Proteinsynthese mit Hilfe radioaktiv markierter Vorstufen

In den Experimenten wurde die DNS- und die Proteinsynthese bei Kontrollkulturen und bei behandelten Kulturen anhand des Einbaus von radioaktivem Thymidin und Leucin in die TCA-unlösliche Zellfraktion verfolgt. Dazu wurden Lösungen dieser radioaktiven Substanzen zu Beginn der Experimente den Kulturen zugesetzt, die vorher mit frischen Nährmedium versetzt worden waren. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeiten betrugen 1, 8 und 24 Stunden. Thiopental wurde in Konzentrationen von 1×10^{-4} M, $3{,}3 \times 10^{-4}$ M und 1×10^{-3} M zugesetzt.

2.5.2.1. Konzentrationen der radioaktiven Substanzen im Kulturmedium

Folgende Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen (Angaben pro 10 ml Medium) jeweils in 0,2 ml serumfreiem Medium den Kulturen zugesetzt:

$\left[\text{methyl-}^{3}\text{H}\right]$ -Thymidin : 2,0 µ Ci (48 µg)

L- $\left[1\text{-}^{14}\text{C}\right]$ -Leucin : 0,2 µ Ci (260 µg)
(unmarkiertes Leucin in BME-Medium)

2.5.2.2. Aufarbeitung der Kulturen

Die Kulturen wurden nach der Inkubation wie folgt aufgearbeitet:

Dekantieren des Mediums (die Zellen bleiben an der Kulturflasche haften),

3 x Waschen mit je 10 ml Earle's Salzlösung (0 °C), jeweils 30 Sekunden,

2 x Extraktion mit 10 ml 5 % Trichloressigsäure (0 °C) jeweils 5 Minuten,

3 x Waschen mit 10 ml 96 % Ethanol (0 °C), jeweils 2 Minuten.

Zum Trocknen wurden die Flaschen, mit der Öffnung nach unten, 24 Stunden bei Raumtemperatur aufgestellt. Dann wurde der Zellrückstand mit 1,5 ml 1 N NaOH 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Aliquote Anteile wurden zur Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 2.5.1.) und der Radioaktivität verwendet.

2.5.2.3. Bestimmung der eingebauten Radioaktivität

0,2 ml des in 1 N NaOH gelösten Zellrückstandes wurde mit 1 ml H_2O (Bidest) und 10 ml Scintillationsflüssigkeit vermischt. Zum Abklingen der nicht durch Radioaktivität verursachten Fluoreszenz (Eigenfluoreszenz) wurden die Proben 24 Stunden im Scintillationszähler Fa. Beckman, Modell LS 100 aufbewahrt, ehe die Radioaktivität 2mal

gemessen wurde (20 Minuten, Fehlerbreite 1 %). Vom Mittelwert der Einzelmessungen wurde der Leerwert abgezogen (0,2 ml 1 N NaOH, 1 ml H_2O und 10 ml Rotiszint 22).

2.6. Statistische Auswertung

Die Werte wurden als Einzelwerte oder Mittelwerte aus n Versuchen angegeben. Streuungsangaben stellen die Standardabweichung dar ($\bar{x} \pm s_x$). Zur Prüfung der Dosisabhängigkeit wurde die Signifikanz der Ergebnisse mit Hilfe der Varianzanalyse und Regressionsanalyse errechnet (Sachs, 1974). In allen anderen Experimenten wurde zum statistischen Vergleich der Mittelwerte der t-Test nach Student verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn

3.1.1. Verteilung in vivo

Die intrazelluläre Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität in den Kontrollversuchen und in der Thiopentalnarkose (150 mg/kg) ist in Tabelle 2 angegeben. Es zeigt sich, daß Thiopental zu einer Veränderung in der Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Form führt. Im Gehirn von Mäusen, die sich in Thiopentalnarkose befanden, kam es bei einer unveränderten Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat zu einer deutlichen Aktivitätszunahme der löslichen Enzymform (Tabelle 2).

In Versuchen, in denen Kontrolltiere in flüssigen Stickstoff getaucht und durchgefroren wurden, zeigte sich, daß es unter diesen Bedingungen auch zu einer Freisetzung der latenten Hexokinaseaktivität, dem dritten Kompartiment, kommt (Tabelle 3).

Die Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität in Kontrollversuchen und nach Durchfrieren zeigen, daß es hierbei zu einer Zunahme der Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat und gleichzeitig zu einer Zunahme der Aktivität der löslichen Hexokinase kommt (Tabelle 3). Die Versuche mit Kontrolltieren und Tieren in Thiopentalnarkose (100 mg/kg) unter den gleichen Bedingungen in flüssigem Stickstoff aufgearbeitet, zeigen keinen Unterschied in der gemessenen Gesamtaktivität und der Aktivität der löslichen Hexokinasefraktion (Tabelle 4).

Tabelle 2 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo (Aufarbeitungszeit 120 Sekunden)

	Hexokinaseaktivität (U/g)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrollen	7,27 ± 0,38	1,89 ± 0,28	5,38
Thiopental	7,37 ± 0,69	2,81 ± 0,26 +	4,56

Thiopental (150 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen 0,9 % Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeit betrug 120 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.1. und 2.2.1. angegeben. Die Messung wurde bei 25 °C durchgeführt. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 25). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$

Tabelle 3 : Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen nach Eintauchen und Durchfrieren in flüssigem Stickstoff.

	Hexokinaseaktivität (U/g)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	13,39	2,89	10,50
	13,38	2,83	10,55
Kontrolle (flüss. N_2)	16,83	5,86	
	16,83	6,05	

Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden wie im Kapitel Methodik unter 2.2.1. angegeben aufgearbeitet. Die anderen Tiere wurden in flüssigen Stickstoff getaucht, durchgefroren und nach dem Auftauen wie oben aufgearbeitet. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte stellen Einzelwerte dar und sind in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 µMol NADPH/min.

Tabelle 4 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen nach Eintauchen und Durchfrieren in flüssigem Stickstoff.

	Hexokinaseaktivität (U/g)	
	Rohhomogenat	lösliche
Kontrolle	17,17 ± 0,99	4,92 ± 0,02
Thiopental	17,36 ± 1,89	4,96 ± 0,71

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten nach Injektion. Die Tiere wurden in flüssigen Stickstoff getaucht, durchgefroren und anschließend wie im Kapitel Methodik unter 2.2.1. angegeben aufgearbeitet. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 26). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 3 - 4.

Tabelle 5 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo (Aufarbeitungszeit 90 Sekunden).

	Hexokinaseaktivität (U/g)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrollen	8,39 ± 0,57	2,18 ± 0,20	6,21
Thiopental	8,50 ± 0,59	2,95 ± 0,21 +	5,55

Thiopental (150 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeit betrug 90 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.1. und 2.2.1. angegeben. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 27). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der Kontrollen:
+ $p < 0{,}001$.

Eine Verkürzung der Aufarbeitungszeit im Vergleich zu den Angaben in Tabelle 2 führt bei unveränderter Aktivität im Rohhomogenat zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität, sowohl im Gehirn von Kontrolltieren als auch in Gehirnen von Tieren in Thiopentalnarkose (Tabelle 5).

3.1.2. Verteilung nach verschiedenen Präparationszeiten in vivo und in vitro

Die Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität in einzelnen Kontrollversuchen und in der Thiopentalnarkose (100 mg/kg) nach Präparationszeiten von 45, 60, 90 und 120 Sekunden sind in Tabelle 6 angegeben. Es zeigt sich, daß bei Mäusen in Thiopentalnarkose die lösliche Hexokinaseaktivität gegenüber den Kontrollen erhöht ist. Die Mäusegehirne wurden nach verschiedenen Präparationszeiten aufgearbeitet, um den Einfluß von hypoxischen Reizen nach Töten der Tiere auf die gemessenen Werte zu prüfen. Aus der Literatur ist bekannt (Knull et al., 1973), daß eine Ischämie zur Abnahme der zytoplasmatischen Hexokinaseaktivität führt. Als Präparationszeit wurde die Zeitspanne vom Töten bis zum Homogenisieren der Gehirne festgelegt. In Vorversuchen zeigte sich (Tabelle 6), daß es sowohl in Kontrollversuchen als auch in der Thiopentalnarkose zu einer Veränderung in der Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und mitochondrialen Enzymform kommt. Wie in Tabelle 7 und 8 angegeben, ändert sich die intrazelluläre Verteilung in der

Thiopentalnarkose bei Präparationszeiten von 45 - 120 Sekunden nicht signifikant. Bei den Kontrolltieren ist allerdings immer noch eine deutliche Zunahme der zytoplasmatischen Aktivität zu verzeichnen (Tabelle 8). Zu jedem Zeitpunkt ist aber die lösliche Hexokinaseaktivität in der Thiopentalnarkose gegenüber den Kontrollen erhöht. Präparationszeiten unter 45 Sekunden waren nicht erreichbar. Die Inkubation der mitochondrialen Gehirnhomogenatfraktion mit Thiopental in einer Konzentration von 0,5 mM führte zeitabhängig zu einer Aktivitätszunahme der zytoplasmatischen Hexokinase in der Inkubationssuspension gegenüber den Kontrollen (Tabelle 8). Auch die Versuche mit kürzer gewählten Inkubationszeiten zeigen, daß es schon sehr schnell zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol kommt (Tabelle 9).

Tabelle 6 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der gelösten und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo nach verschiedenen Präparationszeiten (Messung bei 25 °C / Einzelwerte).

		Hexokinaseaktivität (U/g)		
	Präparationszeit (Sek.)	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	45	7,69	1,90	5,79
	60	7,37	1,61	5,76
	90	7,10	1,45	5,65
	120	7,85	1,39	6,46
Thiopental	45	7,21	2,18	5,03
	60	7,50	2,02	5,48
	90	7,93	1,80	6,13
	120	7,77	1,71	6,06

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeiten betrugen 45, 60, 90 und 120 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.1. und 2.2.1. angegeben. Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte sind in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 1.

Tabelle 7 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo nach verschiedenen Präparationszeiten.

		Hexokinaseaktivität (U/g)		
	Präparationszeit in Sekunden	Rohhomogenat	lösliche	mitochondrial
Kontrolle	45	12,16 ± 0,90	2,85±0,34	9,31
	60	12,24 ± 0,80	2,73±0,40	9,51
	90	12,08 ± 0,84	2,67±0,35	9,41
	120	11,66 ± 0,44	2,49±0,33	9,17
Thiopental	45	12,58 ± 0,86	3,18±0,45	9,40
	60	12,26 ± 0,65	3,09±0,25^{+}	9,17
	90	12,68 ± 0,54	3,09±0,27^{+}	9,59
	120	12,26 ± 0,75	3,13±0,33^{++}	9,13

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeiten betrugen 45, 60, 90 und 120 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.1. und 2.2.1. angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 28). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft: $+ p < 0,05$ $++p<0,01$.

Tabelle 8 : Anstieg der löslichen Hexokinaseaktivität im Mäusehirn nach verschiedenen Präparationszeiten.

Präparationszeit in Sekunden	lösliche Hexokinaseaktivität (U/g) Kontrolle	Thiopental
45	2,85 ± 0,43	3,18 ± 0,45 +
60	2,73 ± 0,40	3,09 ± 0,25 +
90	2,67 ± 0,35	3,09 ± 0,27 +
120	2,49 ± 0,33	3,13 ± 0,33 +

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen intraperitoneal verabreicht, die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. 30 Minuten nach Thiopentalinjektion wurden die Tiere getötet, die Gehirne herauspräpariert und homogenisiert. Die Zeit vom Töten der Tiere bis zum Beginn des Homogenisierens der Gehirne wurde als Präparationszeit festgelegt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 28). U = 1 Einheit des Enzyms angegeben als 1 µMol NADPH/min. + $p < 0,01$ nach dem Maximum-Test für Paardifferenzen (Sachs,1974).

Tabelle 9 : Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität bei Inkubation der mitochondrialen Fraktion aus Mäusehirn mit Thiopental nach längeren Inkubationszeiten.

Inkubationszeit min	Lösliche Hexokinaseaktivität (U/g) Kontrolle	Thiopental
0	0,45	-
5	0,52	1,06
10	0,59	1,04
15	0,66	1,06
20	0,73	1,01
25	0,80	1,00
30	0,89	1,11

Das Gehirngewebe wurde wie unter 2.2.2. beschrieben aufgearbeitet. Das mit einem aliquoten Teil der mitochondrialen Fraktion mitinkubierte Thiopental (0,5 mM) wurde in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Gemessen wurde die Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension. Die Werte sind in U/g Gewebe angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 µMol NADPH/min. In den einzelnen Versuchspaaren (Kontrolle + Thiopental) wurden die Experimente mit der mitochondrialen Fraktion aus demselben Mäusegehirn durchgeführt.

Tabelle 10 : Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität bei Inkubation der mitochondrialen Fraktion aus Mäusehirn mit Thiopental nach kürzeren Inkubationszeiten.

Inkubationszeit min	Lösliche Hexokinaseaktivität (U/g) Kontrolle	Thiopental
0	0,40	-
1	0,45	0,94
2	0,42	0,96
3	0,43	1,10
4	0,45	1,08
5	0,48	1,00
10	0,55	1,18

Das Gehirngewebe wurde wie unter 2.2.2. beschrieben aufgearbeitet. Das mit einem aliquoten Teil der mitochondrialen Fraktion mitinkubierte Thiopental (0,5 mM) wurde in 0,25 M Saccharoselösung gelöst. In den Kontrollversuchen wurde nur 0,25 M Saccharoselösung mitinkubiert. Gemessen wurde die Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität in der Inkubationssuspension. Die Werte sind in U/g Gewebe angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms als 1 µMol NADPH/min. In den einzelnen Versuchspaaren (Kontrolle + Thiopental) wurden die Experimente mit der mitochondrialen Fraktion aus demselben Mäusegehirn durchgeführt.

3.1.3. Korrelation mit dem Narkosezustand

Mäuse erreichen nach Thiopentalapplikation (100 mg/kg) relativ schnell das chirurgische Stadium der Narkose. Die cerebrale Verteilung der Hexokinaseaktivität in Kontrollversuchen und in der Thiopentalnarkose nach 30 Minuten bzw. nach 5 Minuten Narkosezeit ist in Tabelle 11 dargestellt. Es zeigt sich, daß auch in einer Narkosezeit von nur 5 Minuten die Veränderung in der Verteilung der Hexokinaseaktivität nachzuweisen ist.

Wie aus Tabelle 12 zu ersehen, lassen sich die Veränderungen in der Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Thiopentalnarkose auch an Gehirnen von Ratten und Meerschweinchen nachweisen. Bei einer Thiopentaldosis bei Mäusen von 100 mg/kg i.p., bei Ratten von 80 mg/kg i.p. und Meerschweinchen von 32 mg/kg i.p. kam es nach einer Narkosezeit von 5 Minuten zu einer signifikanten Erhöhung der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol. Die Veränderungen liegen alle etwa in der gleichen Größenordnung. Mißt man die Hexokinaseverteilung zu verschiedenen Zeiten nach der Thiopentalinjektion (Tabellen 11 und 13), so läßt sich feststellen, daß die lösliche Hexokinaseaktivität erst im chirurgischen Stadium der Narkose (kein Stellreflex, keine Reaktion auf Schmerzreize) erhöht ist (Abbildung 5).
1 Minute nach Thiopentalinjektion sind die Tiere zwar noch benommen, zeigen aber noch den Stellreflex und reagieren auf Schmerzreize. Zu diesem Zeitpunkt findet man sogar eine signifikante Abnahme der löslichen Hexokinaseaktivität.

Nach 3 Minuten erreichen die Tiere etwa Stadium III der Narkose. Stellreflex und Schmerzreflexe sind nicht mehr nachweisbar. Die lösliche Hexokinaseaktivität ist nun gegenüber den wachen Kontrollen signifikant erhöht. Diese Erhöhungen bleiben bestehen, solange die Tiere in Narkose sind. Etwa 2 Stunden nach Thiopentalinjektion wird die Narkose wieder flacher, die Tiere reagieren wieder auf Schmerzreize und die lösliche Hexokinaseaktivität ist nur mehr wenig, wenn auch signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht. Nach 5 Stunden sind die Tiere wieder völlig wach und zeigen ein normales Verhalten. Die lösliche Hexokinase-aktivität liegt nun wieder im Kontrollbereich.

Tabelle 11 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn von Mäusen nach (verschiedenen) Narkosezeiten von 30 Minuten und 5 Minuten

Narkosezeit in Minuten		Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche
30	Kontrolle	12,01 ± 0,93	2,52 ± 0,25
	Thiopental	12,37 ± 0,74	3,56 ± 0,27 +
5	Kontrolle	12,03 ± 0,56	2,35 ± 0,14
	Thiopental	12,06 ± 0,74	3,48 ± 0,21 +

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 30 Minuten bzw. 5 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeit betrug 120 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.2. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) (Einzelwerte Tabelle 29) angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$

Tabelle 12 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Gehirnen von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen.

Tierart		Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche
Mäuse	Kontrolle	11,36 ± 0,22	2,59 ± 0,09
	Thiopental	11,60 ± 0,26	2,94 ± 0,04 +
Ratten	Kontrolle	12,35 ± 0,18	2,45 ± 0,18
	Thiopental	12,49 ± 0,26	2,97 ± 0,20 +
Meerschweinchen	Kontrolle	12,72 ± 0,14	2,48 ± 0,05
	Thiopental	13,16 ± 0,34	2,85 ± 0,04 +

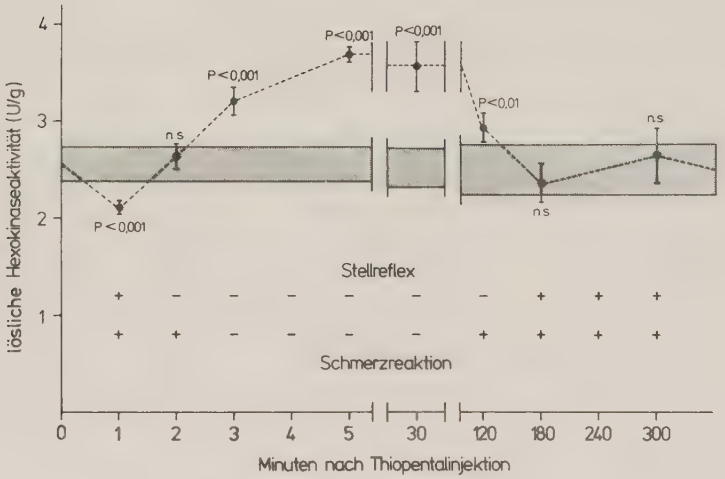
Thiopental wurde in einer Konzentration verabreicht, die bei den Tieren ein chirurgisches Stadium der Narkose erzeugte (Mäuse, 100 mg/kg; Ratten, 80 mg/kg; Meerschweinchen, 32 mg/kg). Die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Aufarbeitung erfolgte 5 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeiten betrugen bei Mäusen 60 Sekunden, bei Ratten 90 Sekunden und bei Meerschweinchen 180 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.3. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 30). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$

Tabelle 13 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Gehirnen von Mäusen in einzelnen Narkosestadien

Minuten nach Thiopental-injektion	Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche
0	12,00 ± 0,58	2,56 ± 0,18
1	12,24 ± 0,44	2,11 ± 0,05 ++
2	12,11 ± 0,22	2,64 ± 0,10
3	12,02 ± 0,38	3,21 ± 0,15 ++
5	12,27 ± 0,45	3,69 ± 0,08 ++
0	12,31 ± 0,29	2,54 ± 0,23
120	12,12 ± 0,29	2,93 ± 0,15 +
180	12,34 ± 0,21	2,36 ± 0,20
300	12,11 ± 0,28	2,64 ± 0,28

Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen i.p. injiziert, die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p.. Die Tiere wurden nach verschiedenen Injektionszeiten getötet. Die Aufarbeitungszeit betrug 90 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.4. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 31). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 6—8 . Die Thiopentalefi kte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}01$, ++ $p < 0{,}001$

Abbildung 5 : Korrelation der cerebralen löslichen Hexokinaseaktivität mit dem Narkosezustand



Thiopental (100 mg/kg) wurde Mäusen intraperitoneal appliziert. Die Tiere wurden nach verschiedenen Injektionszeiten getötet. Vor cerebraler Dislokation wurden der Stellreflex und die Schmerzreaktion geprüft und jeweils als vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) gekennzeichnet. 3 Minuten nach Thiopentalinjektion befanden sich die Tiere in Narkose, 3 Stunden nach der Pharmakoninjektion waren sie noch benommen, 5 Stunden nach der Thiopentalgabe verhielten sich die Tiere wieder normal. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben. Die Anzahl der Versuchstiere war n = 6 - 8. Die Standardabweichung der Kontrollmittelwerte wurde für die 3 unabhängigen Versuchsgruppen (1 - 5, 30, 120 - 300 Minuten) jeweils als punktierte Zone eingezeichnet. Die angegebenen Irrtumswahrscheinlichkeiten (P) wurden mit dem t-Test nach Student berechnet.

3.1.4. Dosisabhängigkeit im isoliert perfundierten Rattenhirn

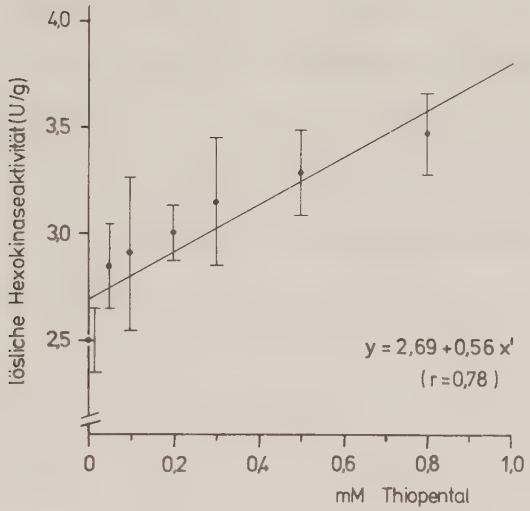
Um die Abhängigkeit der intrazellulären Hexokinaseverteilung von der Thiopentaldosis zu prüfen, wurde das isoliert perfundierte Rattenhirn benutzt. Damit sollten periphere Wirkungen, wie z.B. durch den Kreislauf, den Stoffwechsel und das vegetative Nervensystem, auf die Hexokinaseaktivität ausgeschlossen werden. Wie in Tabelle 14 dargestellt ist, steigt die lösliche Hexokinaseaktivität mit der Konzentration des Thiopental im Perfusionsmedium an. Abbildung 6 zeigt die Beziehung zwischen der Thiopentalkonzentration im Medium (Abszisse) und der löslichen Hexokinaseaktivität im Gehirn (Ordinate). Im Konzentrationsbereich der durchgeführten Untersuchungen besteht bei den Versuchen mit Thiopental eine statistisch signifikante Korrelation zwischen den beiden Größen. Im Vergleich mit den Kontrollen bewirkt Thiopental eine signifikante Erhöhung der löslichen Hexokinaseaktivität. Bei der in Abbildung 6 durchgezeichneten Regressionsgeraden 1. Ordnung ist eine Steigung von 0,56 festzustellen. Die um die Gerade liegenden Meßwerte liegen im Konfidenzbereich.

Tabelle 14 : Dosisabhängiger Anstieg der löslichen Hexokinaseaktivität im isoliert perfundierten Rattenhirn nach Thiopental

Thiopental mM	Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche
0	13,17 ± 0,65	2,50 ± 0,15
0,05	13,00 ± 0,54	2,85 ± 0,20
0,1	12,92 ± 0,53	2,91 ± 0,36
0,2	12,61 ± 0,54	3,02 ± 0,13
0,3	13,25 ± 0,49	3,15 ± 0,30
0,5	13,25 ± 0,56	3,29 ± 0,20
0,8	13,40 ± 0,41	3,48 ± 0,19

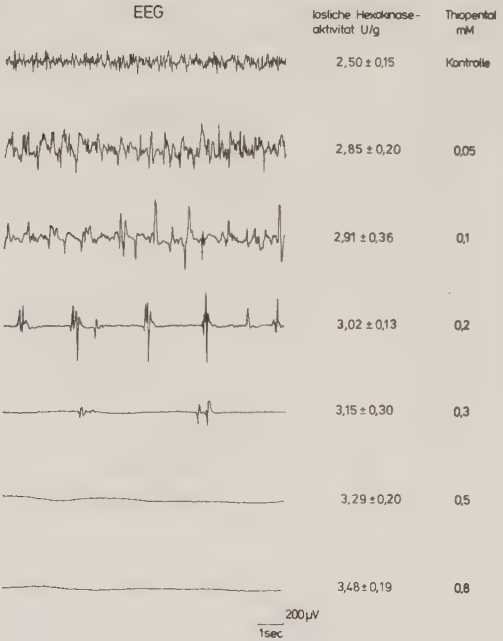
Thiopental wurde in Konzentrationen von 0,05 - 0,8 mM dem Perfusionsmedium zugesetzt. Die Perfusion wurde rezirkulierend durchgeführt. Die Perfusionsdauer betrug 30 Minuten, die Aufarbeitungszeit 120 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.4. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 32). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Die Anzahl der Versuche betrug n = 5 - 9.

Abbildung 6 : Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im isoliert perfundierten Rattenhirn in Abhängigkeit von den Thiopentalkonzentrationen



Thiopental wurde in Konzentrationen von 0,05 - 0,8 mM dem Perfusionsmedium zugesetzt. Die Perfusion wurde rezirkulierend durchgeführt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ (n = 5 - 9) in U/g Gehirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben. Die Regressionsgerade lautet für gleiche Koordinatenabschnitte y = 2,69 + 1,12 x. (Transformation für die angegebene Regressionsgleichung x' = 2 x), r = Korrelationskoeffizient. Die Steigung der Regressionsgeraden ist signifikant von Null verschieden ($p < 0,001$).

Abbildung 7 : Vergleich der EEG-Veränderungen des isolierten Rattenhirns mit der löslichen Hexokinaseaktivität nach Thiopental



Das EEG wurde bipolar von beiden Hemisphären über der Parietalregion abgeleitet. Die Abbildung zeigt jeweils eine der in der Regel symmetrischen und synchronen Kurven nach 30 Minuten Perfusion. Die Werte für die Hexokinaseaktivität sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Hirngewebe (Feuchtgewicht) angegeben und entsprechen denen in Abbildung 6.

EEG-Befunde

Eine Darstellung von EEG-Kurven bei einer Perfusionszeit von 30 Minuten gibt Abbildung 7 wieder. Im EEG der Kontrollperfusionen zeigt sich eine mittelhohe Grundaktivität mit vorherrschenden Frequenzen im Beta-Bereich. Unter Thiopental konnte ein charakteristisches Narkose-EEG registriert werden. Mit steigender Konzentration traten vermehrt langsame Wellen auf. Sie besaßen geringere Amplituden im Theta- und Deltabereich, welche durch einzelne sporadische isolierte Spitzenentladungen unterbrochen wurden. Mit zunehmender Thiopentalkonzentration wurde die Grundaktivität schwächer, und Spitzenentladungen beherrschten das Bild. Bei der höchsten Thiopentalkonzentration im Medium war keine EEG-Aktivität mehr feststellbar. Thiopental zeigte einen erheblichen Einfluß auf die EEG's. Eine weitere EEG-Auswertung wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen.

3.1.5. Verteilung in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratte

Untersuchungen in Hirnstrukturen der Ratte zeigen, daß unter Kontrollbedingungen in allen Regionen eine intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität nachzuweisen ist (Tabelle 15). Die Aktivität im Rohhomogenat nimmt in der Reihenfolge: Cerebellum, Cortex, Rest des Gehirns und Medulla + Pons ab. In der gemessenen Aktivität der löslichen Hexokinase ergibt sich eine etwas andere Reihenfolge: Cerebellum, Cortex, Medulla + Pons und der Rest des Gehirns. Nach Applikation von Thiopental (80 mg/kg i.p.) ergab sich eine Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität. In allen Hirnstrukturen nahm die lösliche Hexokinaseaktivität um einen gleichen Betrag zu. Es zeigte sich, daß in der Thiopentalnarkose in allen Hirnregionen gegenüber den Kontrollen eine signifikante Zunahme der löslichen Hexokinase nachweisbar war (Tabelle 15).

Tabelle 15 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratte

Hirnstrukturen	Feuchtgewicht (mg)	Behandlung	Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche
Cortex	727 ± 63	-	14,03 ± 0,68	2,37 ± 0,18
	734 ± 54	+	14,69 ± 0,63	2,99 ± 0,15
Cerebellum	231 ± 26	-	13,72 ± 0,51	2,66 ± 0,11
	220 ± 20	+	13,91 ± 0,48	3,17 ± 0,32
Medulla + Pons	230 ± 32	-	9,78 ± 0,68	2,11 ± 0,09
	235 ± 37	+	10,02 ± 0,87	2,57 ± 0,15
Rest des Gehirns	350 ± 67	-	11,33 ± 0,89	1,92 ± 0,18
	361 ± 38	+	10,98 ± 0,52	2,33 ± 0,23

Thiopental (80 mg/kg) wurde Ratten i.p. injiziert (+), die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p. (-). Die Aufarbeitung erfolgte 10 Minuten nach Injektion. Die Aufarbeitungszeit betrug 180 Sekunden. Die einzelnen Hirnstrukturen wurden nach Glowinski und Iversen (1966) seziert. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.5. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 33a,b). 1 U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$.

3.2. Einfluß lipophiler Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Hirnrinde

Verschiedene lipophile Pharmaka wurden Ratten intraperitoneal appliziert, Lachgas wurde über eine Atemmaske zugeführt. 30 Minuten später wurden die Tiere getötet, bei der Propanididbehandlung erfolgte die Aufarbeitung im Zustand tiefer Narkose. Die Hexokinaseaktivität wurde nur im Cortex bestimmt. Wie aus Tabelle 16 zu ersehen ist, kommt es nur zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität, wenn die Tiere eine tiefe zentrale Depression zeigen. Diazepam (25 mg/kg i.p.), Ethanol (5 g/kg i.p.), Lachgas (80 %), Phenytoin (300 mg/kg i.p.) und Propanidid (500 mg/kg i.p.) bewirken eine signifikante Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität. Obwohl Amphetamin (25 mg/kg i.p.), Chlorpromazin (25 mg/kg), Haloperidol (20 mg/kg i.p.), Perphenazin (10 mg/kg i.p.) und Phenylbutazon (150 mg/kg i.p.) in relativ hohen Dosen appliziert wurden, konnte in keinem Fall eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität nachgewiesen werden, obwohl die Mittelwerte bei Chlorpromazin, Haloperidol und Perphenazin leicht erhöht schienen. Bei einem verwendeten optisch isomeren Barbituratepaar R(-)- und S(+)-1-Methyl-5-phenyl-5-propyl-barbitursäure (100 mg/kg i.p.), von dem das S(+)-Barbiturat ähnlich wirkte wie ein Convulsivum, führte dieses nur zu einer leichten aber nicht signifikanten Erhöhung der löslichen Hexokinaseaktivität, wohingegen das R(-)-Barbiturat wie Thiopental eine Zunahme der zytoplasmatischen Hexokinaseaktivität bewirkte.

Tabelle 16 : Einfluß lipophiler Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Hirnrinde der Ratte

Pharmakon	Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche	Verhalten der Tiere
Amphetamin (25 mg/kg)	11,58 ± 0,52	2,10 ± 0,08	+ Exzitation
Kontrolle	12,32 ± 0,59	2,10 ± 0,88	
Chlorpromazin (25 mg/kg)	11,88 ± 0,65	2,22 ± 0,31	+ Exzitation
Kontrolle	12,03 ± 0,33	2,04 ± 0,21	
Diazepam (25 mg/kg)	12,85 ± 0,53	2,83 ± 0,28^{+++}	-
Kontrolle	12,89 ± 0,80	2,28 ± 0,14	
Ethanol (5 g/kg)	13,03 ± 0,62	2,52 ± 0,25^{+++}	-
Kontrolle	12,70 ± 0,34	2,03 ± 0,14	
Haloperidol (20 mg/kg)	12,44 ± 0,66	2,31 ± 0,18	+ Katalepsie
Kontrolle	12,25 ± 0,64	2,09 ± 0,21	
Lachgas (80 % / 20 % O_2)	11,88 ± 0,66	2,42 ± 0,29^{+}	+
Kontrolle	11,89 ± 0,43	2,14 ± 0,14	

Fortsetzung Tabelle 16:

Pharmakon	Hexokinaseaktivität (U/g) Rohhomogenat	lösliche	Verhalten der Tiere
R(-)-1-Methyl-5-phenyl-5-propyl-barbitursäure (100 mg/kg)	11,93 ± 0,34	2,67 ± 0,16^{+++}	-
Kontrolle	11,88 ± 0,65	2,13 ± 0,20	
S(+)-1-Methyl-5-phenyl-5-propyl-barbitursäure (100 mg/kg)	11,77 ± 0,77	2,41 ± 0,18	+ Krämpfe
Kontrolle	12,36 ± 0,44	2,28 ± 0,17	
Perphenazin (10 mg/kg)	12,69 ± 0,41	2,18 ± 0,32	+ Katalepsie
Kontrolle	12,46 ± 0,33	1,97 ± 0,31	
Phenylbutazon (150 mg/kg)	12,78 ± 1,32	2,17 ± 0,12	+
Kontrolle	11,98 ± 1,57	2,15 ± 0,14	
Phenytoin (300 mg/kg)	12,73 ± 0,81	2,47 ± 0,12^{++}	+ starke Sedation, Krämpfe
Kontrolle	12,02 ± 0,86	2,21 ± 0,17	
Propanidid (500 mg/kg)	13,10 ± 0,47	2,69 ± 0,23^{+++}	-
Kontrolle	12,65 ± 0,66	2,06 ± 0,18	

Legende Tabelle 16 :

Mit Lachgas wurde eine Inhalationsnarkose (80 % N_2O / 20 % O_2) durchgeführt, alle anderen Pharmaka wurden den Ratten i.p. appliziert. Die Kontrolltiere bekamen physiologische Kochsalzlösung i.p., in Versuchen mit Lachgas blieben sie ganz unbehandelt. Die Behandlungsdauer betrug bei Lachgas und den i.p. applizierten Pharmaka 30 Minuten; die Tiere, die Propanidid erhalten hatten, wurden im Augenblick des Narkoseeintritts getötet. Vor dem Töten wurde der Stellreflex und die Schmerzreaktion geprüft und jeweils als vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) gekennzeichnet. Besondere Verhaltensweisen wurden ebenso aufgeführt. Die Aufarbeitungszeit betrug 150 Sekunden. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.2.3.6. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Gehirn (Feuchtgewicht) angegeben (Einzelwerte Tabelle 34). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Die Anzahl der Versuche betrug n = 8. Die Signifikanz der Veränderungen gegenüber den Kontrollen wurde mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}05$, ++ $p < 0{,}01$, +++ $p < 0{,}001$.

3.3. Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Tumorzellen

3.3.1. Verteilung in Ehrlich-Ascites-Zellen in vivo und in vitro

Wie aus Tabelle 17 zu entnehmen ist, wurden Ehrlich-Ascites-Zellen aus der Peritonealflüssigkeit von Mäusen gewonnen und für in vitro Untersuchungen verwendet. Thiopental wurde in einer Konzentration von 1×10^{-3} M dem Inkubationsmedium zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und einer Temperatur von 37 °C zeigte sich, daß es gegenüber den Kontrollen nach Thiopentaleinfluß zu einer Veränderung in der Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform kommt. Bei unveränderter Aktivität in der Rohhomogenatfraktion bewirkt Thiopental eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität. Die Erhöhung der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol nach Thiopentaleinwirkung war statistisch signifikant (Tabelle 17). Die Resultate entsprechen den am Gehirn erhobenen Befunden (Tabelle 2). Auch bei einer Inkubation in Zellkulturen des Ehrlich-Ascites-Tumors mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Medium und einer Inkubationszeit von einer Stunde bei einer Temperatur von 37 °C ist eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität nachweisbar (Tabelle 18). Die Veränderungen entsprechen denen an in vivo Zellen gewonnenen Ergebnissen.

Tabelle 17 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität an Ascites-Zellen aus Mäusen nach Inkubation in vitro.

	Hexokinaseaktivität (U/g Protein)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	107 ± 2	16 ± 2	91
Thiopental	102 ± 8	33 ± 5 +	69

Asciteszellen wurden aus einer Ascites tragenden Maus gewonnen, mit Medium gewaschen und anschließend in Medium aufgenommen. Die so gewonnenen Zellen wurden im Medium mit Thiopental in einer Endkonzentration von 1×10^{-3} M für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel Methodik unter 2.4.2. und 2.2.1. angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 35). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 4. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$.

Tabelle 18 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Ascites-Zellen in vitro

	Hexokinaseaktivität (U/g Protein)	
	Rohhomogenat	lösliche
Kontrolle	103 ± 14	17 ± 2
Thiopental	102 ± 9	29 ± 3 +

Ehrlich-Ascites-Zellen wurden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt. Nach dem Mediumwechsel wurde den Zellen Thiopental in einer Endkonzentration von 1×10^{-3} M im Medium zugesetzt und 1 Stunde bei 37 °C und 7 % CO_2 im Inkubator inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel Methodik unter 2.4.3.1. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 36). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$.

3.3.2. Verteilung in Harding-Passey-Melanomgewebe und Harding-Passey-Melanomzellen in vitro

Bei der Untersuchung der intrazellulären Verteilung der Hexokinaseaktivität zeigte sich, daß hier im Gegensatz zu den am Gehirn und Ehrlich-Ascites-Zellen erhobenen Befunden das Verhältnis von mitochondrial gebundener Hexokinaseaktivität zu löslicher Hexokinaseaktivität ungefähr gleich ist. Wie aus Tabelle 19 zu ersehen ist, konnte dies in vier Einzelmessungen nachgewiesen werden. Die Aufarbeitung von Melanomgewebe erfolgte sehr schnell, da dies nach der Entnahme sofort gepottert und weiter fraktioniert werden konnte.

Die Untersuchungen an HPM-Zellen in vitro (Tabelle 20) zeigten, daß nach Inkubation mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Medium und einer Temperatur von 37 °C es zu einer Verschiebung des Verhältnisses von mitochondrial gebundener Hexokinaseaktivität zu der im Zytosol gelösten Enzymform kommt. Auch hier zeigt sich bei unveränderter Aktivität der Hexokinase im Rohhomogenat eine signifikante Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität nach Inkubation mit Thiopental.

Tabelle 19 : Intrazelluläre Verteilung der Hexokinase-aktivität in Harding-Passey-Melanomgewebe isoliert aus Mäusen

Hexokinaseaktivität (U/g)		
Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
9,53	4,56	4,97
9,60	4,57	5,03
9,92	4,18	5,74
9,69	4,29	5,40

Harding-Passey-Melanomgewebe wurde aus einer Melanom-tragenden Maus gewonnen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel Methodik unter 2.4.1. und 2.2.1. angegeben. Die Aktivität der mitochondrialen Hexokinase wurde als Differenz aus der Aktivität der Rohhomogenat-Hexokinase und der löslichen Hexokinase ermittelt. Die Werte stellen Einzelwerte dar und sind in U/g Melanomgewebe (Feucht-gewicht) angegeben. U = 1 Einheit des Enzyms angegeben als 1 µMol NADPH/min.

Tabelle 20 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in HPM-Zellen in vitro

	Hexokinaseaktivität (U/g Protein)	
	Rohhomogenat	lösliche
Kontrolle	130 ± 17	35 ± 3
Thiopental	129 ± 16	51 ± 9 +

Harding-Passey-Melanomzellen wurden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt. Nach dem Mediumwechsel wurde den Zellen im Medium Thiopental in einer Endkonzentration von 1×10^{-3} M zugesetzt und 1 Stunde bei 37 °C und 7 % CO_2 im Inkubator inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel Methodik unter 2.4.3.2. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 37). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8. Die Thiopentaleffekte wurden mit dem t-Test nach Student geprüft. Statistisch signifikante Veränderungen gegenüber den Kontrollen: + $p < 0{,}001$.

3.3.3. Dosisabhängiger Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität und auf die DNS- und Proteinsynthese in Harding-Passey-Melanomzellen in vitro

Wie aus Untersuchungen anderer Autoren zu ersehen ist, führen Inkubationen mit Barbituraten an Zellkulturen zu einer Mitosehemmung (Fink und Kenney, 1969; Jackson und Epstein, 1971). Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß es während einer Inkubationszeit von einer Stunde weder zu einer Hemmung der DNS-Synthese (Tabelle 21; Abbildung 8) noch zu einer Hemmung der Proteinsynthese (Tabelle 22; Abbildung 9) kommt. Allerdings führten Inkubationen über einen Zeitraum von 24 Stunden bei einer Konzentration von 1×10^{-3} M Thiopental im Inkubationsmedium zu eindeutigen Hemmeffekten (Abbildung 8 und Abbildung 9). Auch die zelluläre Proteinzunahmerate der Gesamtkulturen war nach 24 Stunden bei Thiopentaleinwirkung eindeutig vermindert (Tabelle 23 und Abbildung 10).

Die Untersuchungen an HPM-Zellen in vitro zeigten, daß es nach Inkubation von $3{,}3 \times 10^{-5}$ M, 1×10^{-4} M und $3{,}3 \times 10^{-4}$ M im Medium (37 °C) dosisabhängig zu einer Zunahme der Hexokinaseaktivität im Zytosol kommt (Tabelle 24). Zusammengefaßt ist der Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Zytosol von HPM-Zellen in Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 21 : Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

Inkubationszeit (Stunden) / Thiopental (M)	cpm/mg Zellprotein 1	8	24
0	7741 ± 253	77879 ± 4946	146295 ± 2710
1×10^{-4}	6980 ± 64	77953 ± 1111	145340 ± 6747
$3{,}3 \times 10^{-4}$	6383 ± 47	75810 ± 1129	119266 ± 21667
1×10^{-3}	5553 ± 110	68906 ± 1393	94046 ± 3625 +

Die Kulturen der HPM-Zellen wurden gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen angesetzt. Zu Beginn des Experiments wurde radioaktiv markiertes Thymidin und Thiopental in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Zugabe und Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeiten betrugen 1, 8 und 24 Stunden. Die Thiopentalkonzentrationen betrugen 1×10^{-4} M, $3{,}3 \times 10^{-4}$ M und 1×10^{-3} M im Medium. Die Anzahl der Experimente n = 2. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.5.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in cpm/mg Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 38). Statistisch signifikante Veränderungen (t-Test nach Student): + $p < 0{,}005$.

Tabelle 22 : Einbau von ^{14}C-Leucin in Protein von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

Inkubationszeit (Stunden) / Thiopental (M)	cpm/mg Zellprotein 1	8	24
0	2808 ± 230	17023 ± 989	39436 ± 1466
1×10^{-4}	2880 ± 269	17170 ± 560	37010 ± 880
$3{,}3 \times 10^{-4}$	2580 ± 243	17200 ± 1040	40076 ± 2535
1×10^{-3}	2508 ± 182	16390 ± 776	34860 ± 8 +

Die Kulturen der HPM-Zellen wurden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt. Zu Beginn des Experiments wurde radioaktiv markiertes Leucin und Thiopental in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Zugabe erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeiten betrugen 1, 8 und 24 Stunden. Die Thiopentalkonzentrationen betrugen 1×10^{-4} M, $3{,}3 \times 10^{-4}$ M und 1×10^{-3} M im Medium. Die Anzahl der Experimente n = 2. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.5.2. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in cpm/mg Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 39). Statistisch signifikante Veränderungen (t-Test nach Student): + $p < 0{,}05$.

Abbildung 8 : Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium (Legende S.75)

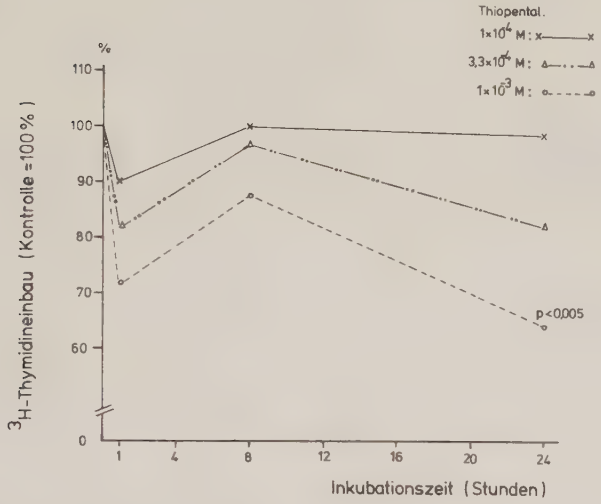


Abbildung 9 : Einbau von ^{14}C-Leucin in Protein von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium (Legende S.76)

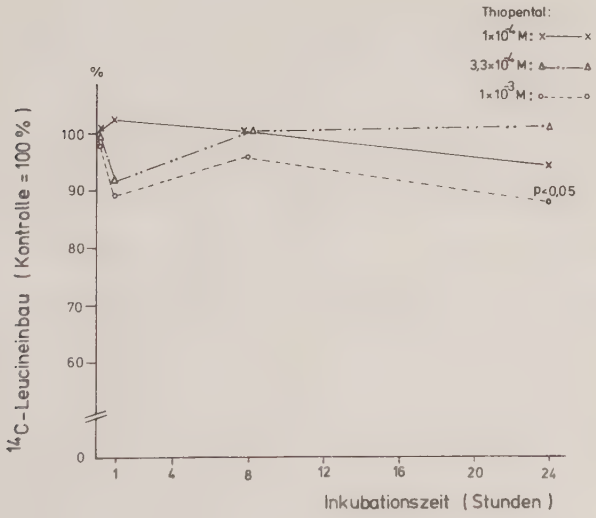


Tabelle 23 : Proteinzunahmerate von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

Inkubationszeit (Stunden) / Thiopental (M)	µg Zellprotein / Kultur 1	8	24
0	475 ± 1	584 ± 34	843 ± 21
1×10^{-4}	467 ± 13	585 ± 8	856 ± 50
$3{,}3 \times 10^{-4}$	470 ± 2	588 ± 7	735 ± 33
1×10^{-3}	485 ± 11	598 ± 7	614 ± 31 +

Die Kulturen der HPM-Zellen wurden gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen angesetzt. Zu Beginn des Experiments wurde Thiopental in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die Zugabe erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C. Die Inkubationszeiten betrugen 1, 8 und 24 Stunden. Die Thiopentalkonzentrationen betrugen 1×10^{-4} M, $3{,}3 \times 10^{-4}$ M und 1×10^{-3} M im Medium. Die Aufarbeitungsbedingungen sind im Kapitel Methodik unter 2.5.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in µg Protein / Kultur angegeben. Die Anzahl der Experimente betrug n = 2 (Einzelwerte Tabelle 40). Statistisch signifikante Veränderungen (t-Test nach Student): + $p < 0{,}02$.

Tabelle 24 : Dosisabhängiger Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in HPM-Zellen in vitro

Thiopental (M)	Hexokinaseaktivität (U/g Protein) Rohhomogenat	lösliche
0	127 ± 17	36 ± 8
$3{,}3 \times 10^{-5}$	131 ± 18	40 ± 10
1×10^{-4}	128 ± 16	47 ± 7
$3{,}3 \times 10^{-4}$	127 ± 15	50 ± 8

Die Kulturen der HPM-Zellen wurden gleichzeitig unter gleichen Bedingungen angesetzt. Nach Mediumwechsel wurde den Zellen im Medium Thiopental in einer Endkonzentration von $3{,}3 \times 10^{-5}$ M, 1×10^{-4} M und $3{,}3 \times 10^{-4}$ M zugesetzt und 1 Stunde bei 37 °C und 7 % CO_2 im Inkubator inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie im Kapitel Methodik unter 2.4.3.2. und 2.2.1. angegeben. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Protein angegeben (Einzelwerte Tabelle 41). U = 1 Einheit des Enzyms, angegeben als 1 µMol NADPH/min. Anzahl der Versuche n = 8.

Abbildung 10 : Proteinzunahmerate von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium (Legende S.78)

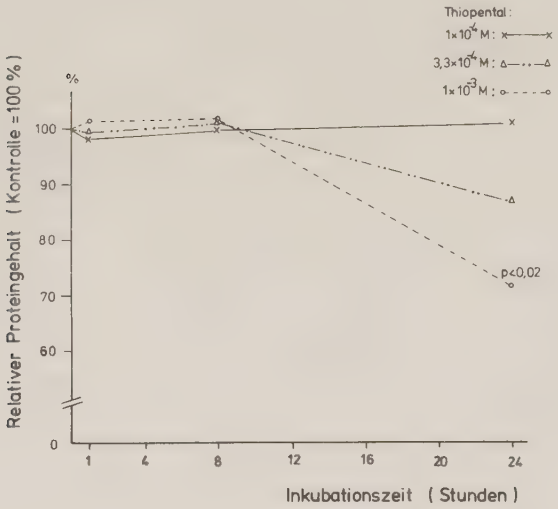
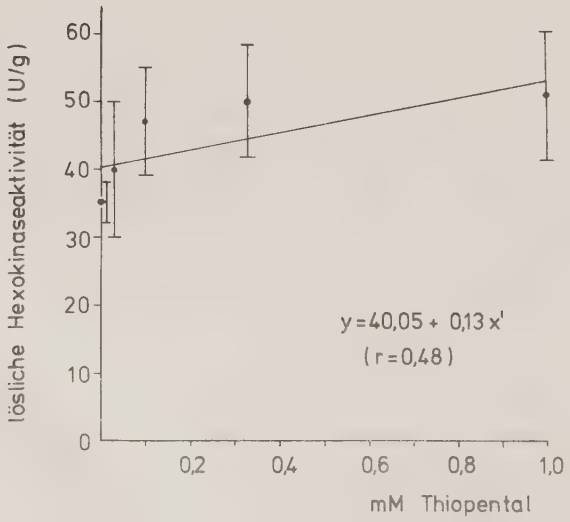


Abbildung 11 : Dosisabhängiger Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in HPM-Zellen in vitro



Legende Abbildung 11 :

Thiopental wurde den Kulturen in Konzentrationen von 0,03 - 1,0 mM im Medium zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde. Die Werte sind als $\bar{x} \pm s_x$ in U/g Protein angegeben und entsprechen denen in Tabelle 20 und 24. Anzahl der Versuche n = 8. Die Regressionsgerade lautet für gleiche Koordinatenabschnitte y = 40,05 + 13,00 x. (Transformation für die angegebene Regressionsgleichung x' = 100 x), r = Korrelationskoeffizient. Die Steigung der Regressionsgeraden ist signifikant von Null verschieden ($p < 0,001$).

4. DISKUSSION

Zahlreiche Untersuchungen zur Regulation der Aktivität der cerebralen Hexokinase lassen den Schluß zu, daß sie einen begrenzenden und kontrollierenden Parameter des Glukoseumsatzes im Gehirn in vivo darstellt. Es ist schon seit langem bekannt, daß unter allen Gewebearten das Gehirn die bei weitem höchste Hexokinaseaktivität besitzt (Crane und Sols, 1953; 1954; Long, 1952; Bennett et al., 1962). Im Gegensatz zu anderen glykolytischen Enzymen ist ein Großteil der Hexokinaseaktivität im Gehirn an Mitochondrien gebunden (Johnson, 1960; Crane, 1962; Bachelard, 1967; Teichgräber und Biesold, 1968). Knull et al. (1973) haben gezeigt, daß die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der äußeren Mitochondrienmembran und dem Hyaloplasma durch den Energiestoffwechsel reguliert werden kann. Die unterschiedlichen Angaben über die Hexokinaseaktivität des Gehirngewebes im partikulären Sediment (35 - 90 %), die von verschiedenen Autoren angegeben werden, hängen sehr wahrscheinlich mit den verschiedenen Aufarbeitungsmethoden zusammen. Die an Mitochondrien gebundene Hexokinaseaktivität kann auf verschiedenen Wegen abgelöst werden (Bachelard, 1967; Wilson, 1967; Biesold und Teichgräber, 1967).

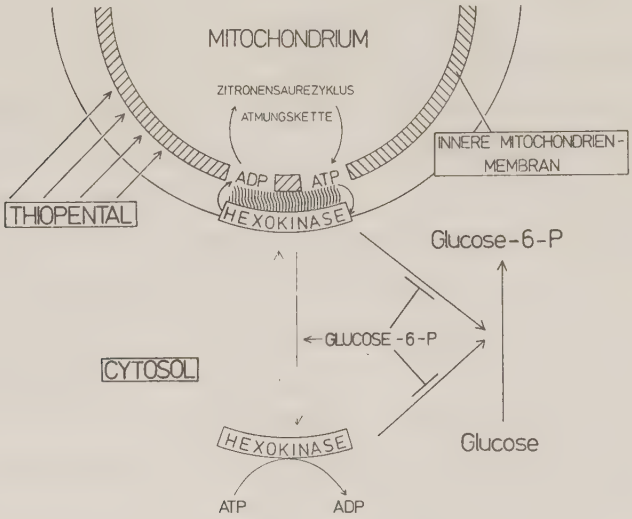
Es sind eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt worden, die die Beziehungen zwischen der an Mitochondrien gebundenen und der im Zytosol gelösten Hexokinaseaktivität aufzuklären versucht haben (Knull et al., 1973; 1974;

Rose und Warms, 1967; Wilson, 1968; Tuttle und Wilson, 1970; Wilkin und Wilson, 1977; Knull et al., 1978). Bei einem erhöhten Energiebedarf der Zelle nimmt die Bindung der Hexokinase an Mitochondrien zu, während bei Steigerung der Energiereserven die Bindung wieder abnimmt. Durch die Bindung der Hexokinase an die äußere Mitochondrienmembran könnte der gesamte Zellstoffwechsel kontrolliert werden, denn das gebundene Enzym müßte ATP für die Phosphorylierung der Glukose direkt aus dem Mitochondrium erhalten und im Austausch dagegen wieder ADP in das Mitochondrium abgeben. Dieser Regulationsmechanismus würde zu einer Stimulation des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette führen (Bessman, 1975). Die im Zytosol gelöste Hexokinase soll zudem eine geringere Aktivität haben als die an Mitochondrien gebundene (Knull et al., 1974; Tuttle und Wilson, 1970).

Durch Verdrängung der Hexokinase aus ihrer mitochondrialen Bindung könnten Narkotika in den so postulierten Regulationsmechanismus eingreifen, was eine Hemmung der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus und der Atmungskette zur Folge hätte (Abbildung 12).

Die in Narkose gemessenen Stoffwechselveränderungen (Anstieg der Glukosekonzentration, Abnahme des Laktats und des Sauerstoffverbrauchs, praktisch keine Veränderungen des ATP) wären damit sehr gut in Einklang zu bringen.

Abbildung 12 : Schematische Darstellung der intrazellulären Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn



Der größere Teil der Hexokinase (z.B. ca. 80 % der Aktivität im Mäuse- und Rattenhirn) ist an die äußere Mitochondrienmembran gebunden, ein geringerer Anteil liegt gelöst im Zytosol vor. Thiopental führt dosisabhängig zu einem Anstieg der löslichen Hexokinaseaktivität. Eine Verdrängung der Hexokinase aus ihrer mitochondrialen Bindung könnte eine Hemmung des Zitronensäurezyklus, der Atmungskette, der Glykolyse und damit des gesamten Energiestoffwechsels zur Folge haben.

Ein etwaiger direkter Einfluß von Narkotika auf die Aktivität der Hefehexokinase wurde bereits von Porsius und van Zwieten (1974) geprüft; dabei konnte kein inhibitorischer Einfluß auf die Enzymaktivität in vitro festgestellt werden. Die Relevanz dieses Befundes für die Untersuchung der Narkotikawirkung im cerebralen Energiestoffwechsel wäre aber nur dann gegeben, wenn er sich auch in Experimenten an Hirnhexokinase bestätigte. Eine direkte Hemmung der Enzymaktivität durch Thiopental konnte weder in Gehirnhomogenaten noch in der löslichen bzw. mitochondrialen Hexokinasefraktion nachgewiesen werden (Bielicki, 1977). Unter in vivo Bedingungen wurde jedoch in Narkose eine Verschiebung der intrazellulären Hexokinaseverteilung im Gehirn festgestellt (Bielicki, 1977). In der Narkose zeigte sich eine signifikant erhöhte lösliche Hexokinaseaktivität.

Wenn ein reversibler Austausch der cerebralen Hexokinase zwischen Mitochondrien und Zytosol einen dynamischen Regulationsprozeß der Enzymaktivität darstellt (Wilson, 1968; Moore und Jöbsis, 1970; Hochman und Sacktor, 1973), müßte die Hexokinase aus ihrer mitochondrialen Bindung verdrängt werden, was zu einer Verminderung der Gesamtaktivität des Enzyms führen könnte.

Einfluß von Thiopental auf die Verteilung des cerebralen Hexokinasegleichgewichtes

In ersten orientierenden Versuchen in Thiopentalnarkose an Mäusen konnte eine Verschiebung der intrazellulären cerebralen Hexokinaseaktivität nachgewiesen werden (Tabelle 2). Wie schon Knull et al. (1973) zeigten, führte zunehmende Ischämie zu einer Abnahme der löslichen Hexokinaseaktivität. Da die Zeit vom Dekapitieren bis zum Homogenisieren zwangsläufig mit einer ischämischen Phase verbunden ist, war es erforderlich, die Aufarbeitungszeiten so kurz wie möglich zu halten. Eine kürzere Zeit führte zu einer Erhöhung der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol, die auch in Thiopentalnarkose signifikant von den Kontrollen verschieden war (Tabelle 5). Wie schon erwähnt, schwanken die Angaben über die lösliche Hexokinaseaktivität. Dabei ist zu berücksichtigen, daß es durchaus auch zu einer Freisetzung der latenten Hexokinase kommen kann (Biesold und Teichgräber, 1967; Teichgräber et al., 1973). Man könnte daher vermuten, daß auch diese relativ geringe aber konstant feststellbare Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität auf einer Aktivierung der latenten Hexokinase beruht. Insgesamt müßte sich dies aber in einer erhöhten Gesamtaktivität niederschlagen. Die ersten beiden orientierenden Versuchsansätze schließen Überlegungen in dieser Richtung aus, da die Gesamthexokinaseaktivität unverändert ist (Tabellen 2 und 5).

Einen weiteren Hinweis dafür, daß die Freisetzung der latenten Hexokinase in diesem Regulationsprozeß keine Rolle spielt, zeigten Versuche, bei denen die Tiere in flüssigem Stickstoff getötet wurden (Tabellen 3 und 4). Es bestätigten sich die Angaben einiger Autoren (Biesold und Teichgräber, 1967; Teichgräber et al.,1973), daß die Freisetzung der latenten Hexokinase erst durch massive Eingriffe an der Mitochondrienmembran erfolgt. Wie aus den Tabellen 3 und 4 zu ersehen, führt die Aktivierung der latenten Hexokinase zu einer Erhöhung der Gesamtaktivität im Rohhomogenat bei gleichzeitiger Zunahme in der löslichen Fraktion. Falls also Thiopental auf irgend eine Art und Weise latente Hexokinase freisetzen würde, müßte sich dies in einer signifikant höheren Hexokinaseaktivität im Rohhomogenat gegenüber der Kontrollen zeigen, was aber nicht der Fall ist.

Die gezeigte Verschiebung in der Verteilung der cerebralen Hexokinaseaktivität unter Thiopental könnte daher als Ausdruck der in der Narkose veränderten Energiestoffwechsellage im Gehirn gedeutet werden. Knull et al. (1973; 1974) zeigten, daß ein strenger Zusammenhang zwischen dem Energiestoffwechsel und dem Gleichgewicht der beiden Enzymformen besteht. So ist z.B. unter ischämischen Bedingungen im Gehirn bei einem erhöhten Energiebedarf eine rapide Konzentrationsabnahme der energiereichen Substrate wie Glukose-6-phosphat und ATP mit einem Anstieg der mitochondrialen Hexokinaseaktivität auf Kosten der gelösten Form verbunden. Es wäre vorstellbar, daß bei einem erniedrigten

Energiebedarf der Zellen in der Narkose ähnliche Mechanismen für die Verschiebung der cerebralen Hexokinaseaktivität zum gelösten Zustand hin verantwortlich sind. Andererseits konnte eine Konzentrationszunahme des bei der Hexokinasereaktion entstehenden Glukose-6-phosphates (und anderer glykolytischer Folgeprodukte) in der Narkose nicht eindeutig nachgewiesen werden (Bielicki und Krieglstein, 1976). In Untersuchungen über energiereiche Phosphate in der Narkose war der ATP-Spiegel ebenfalls unverändert oder nur gering erhöht (Wilson, 1969). Die Verdrängung der an Mitochondrien gebundenen Hexokinase zur gelösten Enzymform hin könnte aber auch durch einen direkten Narkotikaeingriff an der mitochondrialen Membran geschehen. Für eine direkte Thiopentalwirkung sprechen Inkubationsversuche in vitro (Bielicki, 1977). Wurden Hirnhomogenate, die mitochondrial gebundene Hexokinase enthielten, mit Thiopental inkubiert, war eine Zunahme der gelösten Enzymform in der Inkubationssuspension nachweisbar (Bielicki, 1977). Diese Untersuchungen gaben Anlaß zu der Überlegung, ob nicht durch Inkubation in vitro, analog zu kürzeren Aufarbeitungszeiten in vivo, nähere Aussagen über die frühe Phase der Narkose gewonnen werden könnten. Wie sich aber zeigte, war die Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität schon nach sehr kurzen Inkubationszeiten mit Thiopental zur löslichen Hexokinaseaktivität hin verschoben (Tabellen 9 und 10). Da in dem die mitochondriale Hexokinase enthaltenen Saccharosehomogenat eine Aufrecht-

erhaltung des Energiestoffwechsels auszuschließen ist (Mc Ilwain und Bachelard, 1971), dürfte die Verschiebung der cerebralen Hexokinase aus ihrer mitochondrialen Bindung durch einen direkten Thiopentalangriff schon in allerkürzester Zeit zustande kommen.

In weiteren Einzelversuchen (Tabelle 6) zeigte sich, daß bei einer festgelegten Narkosezeit von 30 Minuten mit kürzer werdenden Aufarbeitungszeiten (120 - 45 Sekunden) eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Thiopentalnarkose feststellbar war (Tabellen 7 und 8). Diese Befunde deuten darauf hin, daß auch in vivo eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität der Narkose und nicht einem Aufarbeitungsartefakt zuzuschreiben wäre. Da kürzere Aufarbeitungszeiten in vivo nicht zu erreichen waren, konnten über den Zeitraum unter 45 Sekunden keine Aussagen getroffen werden. Es ist aber zu vermuten, daß in der Ausgangssituation lösliche und an Mitochondrien gebundene Hexokinaseaktivität ungefähr im gleichen Verhältnis vorliegen (Knull et al., 1973). So wie in vitro nach kürzester Zeit eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität nachweisbar war, konnte auch in vivo nach einer Thiopentalnarkose von nur 5 Minuten eine Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichts der Hexokinaseaktivität gezeigt werden (Tabelle 11). Zwischen Narkosezeiten von 30 Minuten und 5 Minuten war kein Unterschied festzustellen (Tabelle 11).

Die Verdrängung der an Mitochondrien gebundenen Hexokinaseaktivität in der Thiopentalnarkose konnte nicht nur an Mäusen, sondern auch an Ratten und Meerschweinchen gezeigt werden (Tabelle 12).

Korrelation der Hexokinaseaktivitätsverschiebung mit dem Narkosezustand

Im Zusammenhang mit der beschriebenen Thiopentalwirkung auf das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinaseaktivität erhob sich nun die Frage, inwieweit der Effekt mit dem Narkosezustand korreliert. Ein Anhaltspunkt für die Annahme, daß die Veränderungen der intrazellulären Hexokinaseverteilung dem Zustand der Narkose entsprechen, deutete sich schon in Versuchen von Bielicki (1977) an. In diesen Experimenten konnte in der Aufwachphase eine Rückverteilung der in tiefer Narkose zur gelösten Form hin verschobenen Hexokinaseaktivität beobachtet werden. In den erhobenen Befunden (Abbildung 5 und Tabelle 13) zeigte sich, daß während der kurzen Phase des Exzitationsstadiums eine signifikant erniedrigte lösliche Hexokinaseaktivität nachweisbar war. Dies würde dafür sprechen, daß es - durch das Exzitationsstadium bedingt - zu einer Beschleunigung der Glykolyse und damit zu einer Zunahme der mitochondrialen Hexokinaseform im Gehirn kommt. In der tiefen Narkose zeigen sich die schon beschriebenen Effekte auf die Hexokinaseverteilung. In der Aufwachphase deuten sich ähnliche

Veränderungen an wie während des Exzitationsstadiums, nämlich eine Abnahme der löslichen Hexokinaseaktivität. Dies könnte im Sinne einer gesteigerten Glykolyse im Aufwachsstadium gedeutet werden. Da die in der Narkose angehäufte Glukose abgebaut werden muß, könnte das Verteilungsgleichgewicht der cerebralen Hexokinase zur aktiveren mitochondrialen Enzymform verschoben sein, wodurch die Phosphorylierung des Substrates beschleunigt werden könnte. Nachdem die Tiere sich wieder normal verhielten, entsprach die Hexokinaseverteilung der Ausgangssituation bzw. den Kontrollbedingungen (Abbildung 5). Es konnte also gezeigt werden, daß die Veränderungen der intrazellulären Hexokinase streng mit der Narkose korrelieren, wobei in tiefer Narkose immer eine Zunahme der gelösten Enzymform nachweisbar ist.

Befunde am isoliert perfundierten Rattenhirn

In Experimenten in vitro konnte schon von Bielicki und Krieglstein (1977a) ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Verdrängungseffekt und der Thiopentaldosis gezeigt werden. In vivo waren die dort erhobenen Befunde zwar signifikant, aber nicht sehr ausgeprägt. Unter diesen Voraussetzungen war die Hexokinaseverteilung in unterschiedlichen Narkosetiefen unter in-vivo-Bedingungen von besonderem Interesse, da ja schon eine gute Korrelation mit dem Narkosezustand nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5).

Das Modell des isoliert perfundierten Rattenhirns (Andjus et al., 1967; Fleck et al., 1972) eignete sich dazu ganz besonders, da dem Gehirn mit dem Perfusionsmedium unterschiedliche Thiopentalkonzentrationen angeboten werden konnten, besonders höhere als in vivo erreichbar. Da bei in vivo Versuchen in der Narkose die Kreislauffunktionen nicht konstant sind und die Gefahr einer Hypoxie besteht, die die Hexokinaseverteilung beeinflussen könnte (Knull et al., 1973; Broniszewska-Ardelt und Gromek, 1972; Broniszewska-Ardelt und Miller, 1974), ist die Perfusionsapparatur für eine Erzielung der notwendigen Sauerstoffversorgung am isolierten Gehirn besonders geeignet. Es ist bekannt, daß im paralytischen Stadium der Narkose gerade umgekehrte Veränderungen im cerebralen Energiestoffwechsel auftreten können als die, die im Toleranzstadium zustande kommen (LePage, 1946; McIlwain und Bachelard, 1971; Michenfelder und Theye, 1975). Dieses Versuchsmodell wurde schon häufiger zur Untersuchung von Pharmakoneffekten auf das Gehirn angewandt (Krieglstein und Stock, 1974). Die in Versuchen mit Thiopental beobachteten Veränderungen stimmen gut mit Literaturangaben überein (Hein et al., 1975; Krieglstein und Stock, 1975; Bielicki und Krieglstein, 1977; Bruns et al., 1978). Unter Thiopentalnarkose traten typische Veränderungen im EEG auf (Kiersey et al., 1951). Schon bei geringen Thiopentalkonzentrationen (0,05 mM - 0,1 mM) im Perfusionsmedium, die im EEG eine geringe Narkosetiefe anzeigten, war eine Zunahme der löslichen Hexo-

kinaseaktivität nachzuweisen (Tabelle 14). Bei Erhöhung der Thiopentalkonzentration auf 0,15 mM im Perfusionsmedium wurde ein EEG (Abbildung 7) erreicht, das demjenigen des Menschen im Toleranzstadium entspricht (Brodie et al., 1950; 1952; Brand et al., 1961). Mit steigender Thiopentalkonzentration (0,2 mM - 0,8 mM) nahm die lösliche Hexokinaseaktivität bis in das paralytische Stadium weiter zu, was durch das EEG (Abbildung 7) angezeigt wurde. Bei genauer Analyse der Hexokinasewerte könnte man annehmen, daß bei der Konzentration von 0,5 mM im Perfusionsmedium ein Plateau erreicht wird; bei 0,8 mM kann aber noch eine weitere Zunahme festgestellt werden (Abbildung 6). Es konnte hiermit gezeigt werden, daß Thiopental dosisabhängig, in vivo Versuchen vergleichbar, zu einem Anstieg der löslichen Hexokinase führt. Die gemessene Gesamtaktivität der Hexokinase war in allen Versuchen einschließlich der Kontrollen unverändert (Tabelle 14). Besonders interessant war das Verhalten der Hexokinase während der verschiedenen Narkosestadien. Streßfaktoren im Exzitationsstadium könnten den Anteil der mitochondrial gebundenen Hexokinase vergrößern, um den glykolytischen Fluß zu verbessern; dem Thiopentaleffekt würde somit entgegengewirkt. Abgesehen von einer größeren Streuung der Werte gab es dafür keine Hinweise. Die im paralytischen Narkosestadium drohende Hypoxie konnte durch die gewählte Versuchsanordnung vermieden werden, wodurch eine gleichbleibende Sauerstoffversorgung des Gehirngewebes garantiert wurde. Das könnte auch der Grund dafür sein, daß eine dosis-

abhängige Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse am isoliert perfundierten Rattenhirn sprechen ebenfalls für einen direkten Zusammenhang des Narkosezustands mit der intrazellulären Verschiebung des Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität.

Untersuchungen in unterschiedlichen Hirnstrukturen

Wie in der Literatur schon mehrfach berichtet, zeigen sich bei Untersuchungen an verschiedenen Hirnregionen in Bezug auf den Glukosestoffwechsel unterschiedliche Umsatzgeschwindigkeiten. Daß dies im Gehirn auch für die Hexokinaseaktivität zutrifft, konnte von Bennett et al. (1962) und Bigl et al. (1971) in detaillierten Untersuchungen nachgewiesen werden. Die höchste Gesamtaktivität findet sich in der Großhirnrinde bzw. im Cerebellum (graue Substanz), die geringste Hexokinaseaktivität in Medulla und Pons (weiße Substanz). Die Angaben von Bennett et al. (1962) bezüglich der Gesamtaktivität decken sich recht gut mit den hier erhobenen Befunden und stimmen sowohl in der Größenordnung als auch in der Zuordnung der Regionen überein. Dagegen fanden Bigl et al. (1971) bei unterschiedlichen Gesamtaktivitäten der einzelnen Hirnregionen eine gleichbleibende Aktivität der löslichen Hexokinase. Diese Ergebnisse stehen daher im Gegensatz zu den in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunden. Wie aus Tabelle 15

zu ersehen, ist das Verhältnis von Gesamthexokinaseaktivität zu löslicher Hexokinaseaktivität in den untersuchten Strukturen ungefähr gleich. Die in Versuchen am Ganzhirn in Thiopentalnarkose nachgewiesene Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität (Tabelle 12) läßt sich auch auf die untersuchten Hirnstrukturen übertragen (Tabelle 15).

Die Ergebnisse der mit Thiopental durchgeführten Untersuchungen bilden einen neuen Ansatzpunkt für die Erklärung der Narkotikawirkung auf den cerebralen Energiestoffwechsel. Eine Verminderung der Glykolyserate durch die Verschiebung der Hexokinaseaktivität von der mitochondrialen zur gelösten Enzymform wäre auch für andere narkotisch wirksame Pharmaka trotz unterschiedlicher chemischer Struktur vorstellbar.

Beeinflussung durch lipophile Pharmaka

Wie schon Bielicki (1977) zeigen konnte, führen Pharmaka, die üblicherweise als Narkotika verwendet werden, immer zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol. Die Hypothese, daß sich Substanzen, die erst in höchster Dosierung eine Narkose erzwingen, in ihrem Einfluß auf das intrazelluläre Gleichgewicht der Hexokinaseaktivität ähnlich verhalten würden, konnte in Experimenten an Ratten mit Substanzen wie Diazepam, Ethanol, Lachgas, Phenytoin und Propanidid bestätigt werden(Tabelle 16). Alle diese Pharmaka führen nach einer Applikationszeit von 30 Minuten zu einer

Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol der Hirnrinde. Bei Verwendung von Substanzen wie Amphetamin, Chlorpromazin, Haloperidol, Perphenazin und Phenylbutazon war gegenüber den Kontrollen in der Hexokinaseaktivität keine Veränderung feststellbar (Tabelle 16), obwohl die Dosierung fast immer nahe der LD_{50} lag und daher in vivo im ZNS kaum höhere Konzentrationen erreicht werden können. Diese Ergebnisse stützen die These, daß im narkotischen Zustand immer eine Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität zu beobachten ist, und die Veränderung nicht allein von den lipophilen Eigenschaften der Substanz abhängt.

Die vorgenommenen Untersuchungen mit Substanzen, die sich nur in ihrem optischen Drehsinn unterscheiden, bestätigen die gewonnenen Ergebnisse ganz besonders. Die Verwendung eines optisch isomeren Barbituratpaares erschien interessant, da es sich hierbei um Substanzen mit pharmakologisch völlig unterschiedlichen Wirkqualitäten handelt (Knabe et al.,1978). Bei gleicher Dosierung (100 mg/kg) führt das R(-)-Barbiturat zu einer tiefen Narkose, während das S(+)-Barbiturat stark konvulsiv wirkt und damit keine Narkose erreicht wird. Die Untersuchungen im Cortex der behandelten Tiere bestätigen zuvor erhobene Befunde, daß es nur in Narkose zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol kommt (Tabelle 16). Dies bestätigt wiederum die strenge Korrelation der Veränderungen der Hexokinaseaktivität mit dem Narkosezustand.

Entsprechende Ergebnisse konnten auch von Bielicki und Krieglstein (1977 b) mit der Umkehrung des Barbituratteffektes auf das intrazelluläre Hexokinasegleichgewicht durch zusätzliche Gabe von Pentetrazol während der Barbituratnarkose gewonnen werden. Die Tatsache, daß sich die Veränderungen des Verteilungsgleichgewichtes der cerebralen Hexokinaseaktivität nach Aufheben der Narkose durch die Pentetrazolgabe zurückbildet, obwohl das Narkotikum noch in gleich hoher Konzentration im Gehirn vorliegt, schließt eine mögliche unspezifische, mit der Narkose selbst nicht zusammenhängende Barbituratwirkung aus. Für einen dementsprechenden spezifischen Zusammenhang zwischen Beeinflussung des intrazellulären Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität und Narkose sprechen die mit dem optisch isomeren Barbituratepaar gewonnenen Ergebnisse (Tabelle 16).

Ebenfalls eine große Rolle für die narkotische Wirkung von Pharmaka scheinen ihre lipophilen Eigenschaften zu spielen. Es konnte gezeigt werden, daß die Wirkungsstärke eines Narkotikums und seine Lipidaffinität gut miteinander korrelieren (Eger et al., 1965; Saidman et al., 1967).

Wie Bielicki (1977) nachgewiesen hat, ist eine eindeutige Beziehung zwischen der Ablösung der mitochondrialen Hexokinase und der Lipophilie einiger Barbiturate nicht feststellbar.

Weiterführende Untersuchungen (Hanke, 1979) bestätigten die Ergebnisse und schließen aus, daß allein die Lipophilie einer Substanz für die Zunahme der löslichen Hexokinase-

aktivität im Zytosol verantwortlich ist. In Anlehnung an die Untersuchungen von Seemann und Kwant (1969) und Seeman (1972) kommt es erst in höheren Konzentrationen von Chlorpromazin (eines stark lipophilen Pharmakons) zu einer Ablösung der mitochondrial gebundenen Hexokinaseaktivität (Hanke et al., 1979). Die Autoren konnten sogar nachweisen, daß es am isoliert perfundierten Rattenhirn mit Chlorpromazin in einer in vivo nicht verwendbaren Dosierung zu einer Abnahme der löslichen Hexokinaseaktivität kommt.

Die Lipophilie einer Substanz ist demnach zwar Voraussetzung für ihre narkotische Wirksamkeit, es besteht aber keine Korrelation zwischen der Lipophilie und der Verschiebung des intrazellulären Hexokinasegleichgewichts. Die dargestellten Ergebnisse bestätigen, daß unterschiedlich narkotisch wirksame Substanzen die Hexokinaseaktivität vermindern können, indem sie das intrazelluläre Verteilungsgleichgewicht des Enzyms so beeinflussen, daß die gelöste weniger aktive Hexokinaseform im Gehirn zunimmt. Für die in Narkose beobachtete Hemmung des cerebralen Glukoseabbaues könnte aber durchaus auch die Beeinträchtigung anderer die Glykolyserate regulierende Enzyme, z.B. die Phosphofruktokinase oder Pyruvatkinase mit verantwortlich sein. Im Gegensatz zur Hexokinase liegen die cerebrale Phosphofruktokinase bzw. Pyruvatkinase fast ausschließlich im Zytosol gelöst vor (Abood et al., 1959; Brunngraber und Abood, 1960; Johnson, 1960). Wie Bielicki et al. (1979) nachweisen konnte, hatte die Thiopentalnarkose weder auf die Phosphofruktokinase- noch auf die Pyruvatkinaseverteilung einen Einfluß.

Untersuchungen an Zellkulturen

Wie schon verschiedene Autoren zeigen konnten, liegen bei Ascites-Tumorzellen ähnliche Verteilungsverhältnisse der intrazellulären Hexokinaseaktivität wie in Hirnhomogenaten vor (Rose und Warms, 1967; Kosow und Rose, 1969). Die Autoren Gumaa und McLean (1969) geben die Bindungsverhältnisse mit 28 %, Wu und Racker (1959) mit 60 %, McComb (1959) mit 53 % gebundener Hexokinaseaktivität an. Gumaa und McLean (1969) führen diese Ergebnisse auf die unterschiedlichen Aufarbeitungsmethoden zurück. Die von Rose und Warms (1967) angegebenen Verhältnisse über die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität stimmen gut mit den in Tabelle 17 angegebenen Werte überein.

An Asciteszellen in vivo konnte nachgewiesen werde, (Tabelle 17), daß es nach einer Inkubation mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität im Zytosol kommt. Im Medium waren Unterschiede in der Hexokinaseaktivität nicht nachweisbar. Die so gewonnenen Ergebnisse an Asciteszellen in vivo (Tabelle 17) ließen sich auch auf Ascites-Zellen übertragen, die in vitro in Kultur gezüchtet wurden (Tabelle 18). Auch hier führte eine Inkubation mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Inkubationsmedium zu einer Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichts der Hexokinaseaktivität (Tabelle 18).

Diese Vorversuche eröffneten grundsätzlich die Möglichkeit, an Zellkulturen bzw. an isolierten Zellen weiter-

führende Untersuchungen durchzuführen. Für die anschließenden Untersuchungen standen Harding-Passey-Melanomzellen sowohl in vivo (Melanom) als auch in vitro zur Verfügung. Die orientierenden Versuche an HP-Melanomen zeigten, daß hier das Verhältnis zwischen gelöster Hexokinaseaktivität und an Mitochondrien gebundener Hexokinaseaktivität ungefähr gleich war (Tabelle 19). Der Grund dafür könnte darin zu suchen sein, daß das Melanom direkt homogenisiert werden konnte, also wesentlich schneller als Gehirngewebe oder Zellen aus Kulturflaschen.

In ersten Versuchen an in vitro gezüchteten Melanomzellen zeigte sich, daß das Verhältnis zwischen gelöster Hexokinaseaktivität und mitochondrial gebundener Hexokinaseaktivität dem der Asciteszellen und im Gehirn in etwa entsprach (Tabelle 20). Auch an HPM-Zellen war nach Inkubation mit Thiopental in einer Konzentration von 1×10^{-3} M im Medium eine Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität nachweisbar (Tabelle 20).

Wie schon erwähnt, hatte Bernard (1878) bereits auf den hemmenden Effekt von Narkotika auf die Zellteilung hingewiesen,und Östergreen (1944) hatte zeigen können, daß nahezu alle Pharmaka mit Narkosewirkung Mitosen blockieren können. In Monolayerkulturen von Mäusezellen führt Zugabe von Amobarbital zu einer Inhibition der Proliferation, doch setzte nach Absetzen des Barbiturates wieder eine normale Proliferationsrate ein (Fink und Kenney, 1969). Eine ähnliche, reversible Proliferationshemmung entstand bei Inkubation

mit verschiedenen Barbituraten u.a. Thiopental, an Kulturen von Rattenleberhepatomzellen (Jackson und Epstein, 1971).

Um solche wachstumsinhibitorischen Einflüsse im Untersuchungszeitraum (eine Stunde Inkubationszeit) ausschließen zu können, mußten vor Beginn der Versuche die Auswirkungen von Thiopental auf die Proteinsynthese näher charakterisiert werden. Die Ergebnisse an HPM-Zellen (Tabellen 21, 22, 23) zeigen, daß es erst nach einem Zeitraum von 8 Stunden zu Veränderungen in den untersuchten Parametern kommt. Eindeutige Hemmeffekte waren vor allem im Thymidineinbau nachweisbar. Inkubationszeiten von 24 Stunden zeigten bei allen geprüften Parametern signifikante Hemmeffekte (Abbildungen 8, 9, 10). Der für die Inkubationszeit von einer Stunde gewählte Zeitraum konnte damit als gesichert gelten, d.h. es treten noch keine die DNS- oder Proteinsynthese hemmenden Effekte auf, die eventuell in den Energiestoffwechsel eingreifen könnten.

In weiteren Untersuchungen zeigte sich hier ebenso wie am isoliert perfundierten Rattenhirn, daß mit Thiopental dosisabhängig zunehmend eine Ablösung der gebundenen Hexokinase erfolgte (Tabelle 24). Anhand dieser Befunde könnte auch unter Umständen erklärt werden, wie es nach gebremstem Energiestoffwechsel durch die intrazelluläre Hexokinaseregulation zu einer Proliferationshemmung käme.

Die erhobenen Befunde stimmen bisher, was die Regulation der Hexokinaseaktivität in der Narkose betrifft, jedenfalls gut mit den Ergebnissen am Gehirn überein. Damit kann angenommen werden, daß Zellkulturuntersuchungen einen klärenden Beitrag zum Zusammenhang zwischen Narkose, Zellstoffwechsel und Hexokinaseverteilung liefern könnten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß von Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität geprüft werden. Die Experimente wurden in vivo und in vitro an Gehirngewebe und an Tumorzellen durchgeführt.

1. In Thiopentalnarkose nahm die lösliche Hexokinaseaktivität im Mäusegehirn zu. Dagegen blieb die meßbare Gesamthexokinaseaktivität unverändert.

2. Dieser Thiopentaleffekt auf die intrazelluläre Hexokinaseverteilung hing nicht ab von den postmortalen Präparationszeiten (45 - 120 Sekunden) der Mäusegehirne. Präparationszeiten unter 45 Sekunden waren nicht erreichbar.

3. Es konnte eine strenge Korrelation zwischen Hexokinaseverteilung und Narkosezustand gezeigt werden. Der Anstieg der Hexokinaseaktivität im Zytosol war nur im chirurgischen Stadium der Narkose nachweisbar, in der Aufwachphase konnte eine Rückverteilung zum Ausgangszustand gemessen werden.

4. Die Dosisabhängigkeit des Thiopentaleffektes auf die Hexokinaseverteilung wurde am isoliert perfundierten Rattenhirn geprüft. Die lösliche Hexokinaseaktivität nahm mit steigender Thiopentalkonzentration im Medium (0,05 - 0,8 mM) zu, während die EEG-Aktivität bis zur Isoelektrizität abnahm.

5. Die Verschiebung des intrazellulären Gleichgewichtes der Hexokinaseaktivität in der Thiopentalnarkose konnte nicht nur bei Mäusen, sondern auch bei Ratten und Meerschweinchen nachgewiesen werden. Die Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität zeigte sich in verschiedenen Hirnstrukturen (Cortex, Cerebellum, Medulla + Pons und im Rest des Gehirns) der Ratte.

6. Bei der Prüfung lipophiler Pharmaka ergab sich, daß durch eine Injektion von Amphetamin, Chlorpromazin, Haloperidol, Perphenazin und Phenylbutazon auch in hohen Dosierungen (LD_{50}) keine Verschiebung des Hexokinasegleichgewichtes zu erreichen war. Die Applikation von Diazepam, Ethanol, Lachgas, Phenytoin und Propanidid führte zu einer Zunahme der löslichen Hexokinaseaktivität. Die Untersuchungen von enantiomeren Barbituraten (S(+)- und R(-)-1-Methyl-5-phenyl-5-propylbarbitursäure) ergab, daß nur das narkotisch wirksame R(-)-Barbiturat eine signifikante Verschiebung der Hexokinaseverteilung bewirkte. Die Verdrängung der Hexokinase aus der mitochondrialen Bindung schien also nicht allein von den lipophilen Eigenschaften der Substanzen abzuhängen. Voraussetzung war offenbar auch das Erreichen des narkotischen Zustandes.

7. Untersuchungen an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen und Zellen des Harding-Passey-Melanoms zeigten eine ähnliche intrazelluläre Verteilung zwischen mitochondrial gebundener und im Zytosol gelöster Hexokinaseaktivität wie in Gehirngewebe. Inkubationen mit Thiopental führten auch hier zu einer Zunahme der löslichen Fraktion. Es konnte ebenfalls eine dosisabhängige Verschiebung nachgewiesen werden.

6. LITERATUR

Abood, L.G., Brunngraber, E.G., Taylor, M.: Glycolytic and oxidative phosphorylative studies with intact and disrupted rat brain mitochondria. J. biol. Chem. 243, 1307 (1959).

Aldridge, W.N.: Action of barbiturates upon respiratory enzymes. Ciba Foundation Symposium: Enzymes and drug action. S. 155, Churchill Ltd. 1962.

Aldridge, W.N., Parker, V.H.: Barbiturates and oxidative phosphorylation. Biochem. J. 76, 47 (1960).

Andjus, R.K., Suhara, K., Sloviter, H.A.: An isolated, perfused rat brain preparation, its spontaneous and stimulated activity. J. appl. Physiol. 22, 1033 (1967).

Bachelard, H.S.: The subcellular distribution and properties of hexokinases in the guinea-pig cerebral cortex. Biochem. J. 104, 286 (1967).

Bain, J. A.: Enzymatic aspects of barbiturate action. Fed. Proc. 11, 653 (1952).

Bayreuther, K.: Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus. Z. Naturforschung 76, 554 (1952).

Bennett, E.L., Drori, J.B., Krech, D., Rosenzweig, M.R., Abraham, S.: Hexokinase activity in brain. J. biol. Chem. 237, 1758 (1962).

Bennett, M.J., Timperly, W.R., Taylor, C.B., Hill, A.S.: Isoenzymes of hexokinase in the developing, normal and neoplastic human brain. Europ. J. Cancer 14, 189 (1978).

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie 1970.

Bernard, C.: Anesthesiques et l'asphyxie. Paris: Balliére 1875.

Bernard, C.: Leçons sur les Phénomènes de la Vie communs aux Animaux et aux Végétaux. Paris: Ballière 1878.

Bessman, S.P.: The hexokinase acceptor theory of insulin action - hormonal control of functional compartmentation. Life Sciences 16, 1215 (1975).

Biebuyck, J.F., Hawkins, R.A.: The effect of anaesthetic agents on brain tissue metabolite patterns. Brit. J. Anaesth. 44, 226 (1972).

Bielicki, L., Krieglstein, J.: Inhibition of glucose phosphorylation in rat brain by thiopental. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 25 (1976).

Bielicki, L.: Die cerebrale Hexokinase als ein möglicher Angriffspunkt der Narkotika. Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde. Philipps-Universität Marburg 1977.

Bielicki, L., Krieglstein, J.: Solubilization of brain mitochondrial hexokinase by thiopental. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 61 (1977 a).

Bielicki, L., Krieglstein, J.: The effect of anesthesia on brain mitochondrial hexokinase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 229 (1977 b).

Bielicki, L., Krieglstein, J., Wever, K.: Key enzymes of glycolysis in brain as influenced by thiopental. Arzneimittel-Forsch. Zur Publikation eingereicht 1979.

Biesold, D., Teichgräber, P.: Activation and solubilization of particle-bound hexokinase in rat brain. Biochem. J. 103, 13c (1967).

Bigl, V., Biesold, D., Dowedowa, E.L., Pigarewa, S.D.: Die Hexokinaseaktivität verschiedener Hirnregionen der Katze. Acta biol. med. germ. 26, 27 (1971).

Brand, L., Mazzia, V.B.D., van Poznak, A., Burns, J.J., Mark, L.C.: Lack of correlation between electroencephalographic effects and plasma concentration of thiopentone. Brit. J. Anaesth. 33, 92 (1961).

Brodie, B.B., Bernstein, E., Mark, L.C.: The role of body fat in limiting the duration of action of thiopental. J. Pharmacol. exp. Ther. 105, 421 (1952).

Brodie, B.B., Mark, L.C., Papper, E.M., Lief, P.A., Bernstein, E., Rovenstine, E.A.: The fate of thiopental in man and a method of its estimation in biological material. J. Pharmacol. exp. Ther. 98, 85 (1950).

Brody, T.M.: The uncoupling of oxidative phosphorylation as a mechanism of drug action. Pharmacol. Rev. 7, 335 (1955).

Brody, T.M., Bain, J.A.: Effect of barbiturates on oxidative phosphorylation. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 77, 50 (1951).

Brody, T.M., Bain, J.A.: Barbiturates and oxidative phosphorylation. J. Pharmacol. exp. Ther. 110, 148 (1954).

Broniszewska-Ardelt, B., Gromek, A.: The effects of mitochondria on the glycolytic activity of guinea pig brain cytoplasm under normal and hypoxical conditions. Serie des sciences bilogiques. Bull. Acad. pol. Sci. Biol. 20, 591 (1972).

Broniszewska-Ardelt, B., Miller, A.T.: Hypoxic changes in brain hexokinase distribution: phylogenetic and developmental considerations. Comp. Biochem. Physiol. 49 B, 151 (1974).

Brunner, E.A., Passonneau, J.V., Molstad, C.: The effect of volatile anaesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. J. Neurochem. 18, 2301 (1971).

Brunngraber, E.G., Abood, L.G.: Mitochondrial glycolysis of rat brain and its relationship to the remainder of cellular glycolysis. J. biol. Chem. 235, 1847 (1960).

Bruns, H., Krieglstein, J., Wever, K.: Narkose und intrazelluläre Verteilung der cerebralen Hexokinase. Anaesthesist 27, 557 (1978).

Carlsson, C., Harp, J.R., Siesjö, B.K.: Metabolic changes in the cerebral cortex of the rat reduced by intravenous pentothalsodium. Acta anaesth. scand. 57, 7 (1975).

Chance, B.: Effects of anesthesia on metabolism and cellular functions. Pharmacol. Rev. 17, 183 (1965).

Chance, B., Hollunger, G.: Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. I. Effects of amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol. J. biol. Chem. 278, 418 (1963).

Clements, J.A., Wilson, K.M.: The affinity of narcotic agents for interfacial films. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1008 (1962).

Copley, M., Fromm, H.J.: Kinetic studies of the brain hexokinase reaction. A reinvestigation with the solubilized bovine enzyme. Biochemistry 6, 3503 (1967).

Crane, R.K., Sols, A.: The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates. J. biol. Chem. 203, 273 (1953).

Crane, R.K., Sols, A.: The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds. J. biol. Chem. 210, 597 (1954).

Crane, R.K.: Hexokinases and Pentokinases. In: The Enzymes. Vol. 6 (Boyer, P.D., Lardy, H., Myrbäck, K., eds.), S. 47, New York: Academic Press 1962.

Craven, P.A., Basford, R.E.: Brain hexokinase: immunohistochemical localization at the light microscopic level. Biochemistry 8, 3520 (1969).

Dedrick, D.F., Scherer, Y.D., Biebuyck, J.F.: Use of a rapid brainsampling technique in a physiologic preparation: effects of morphine, ketamine, and halothane on tissue energy intermediates. Anesthesiology 42, 651 (1975).

Desci, L.: Über die kombinierte Wirkung von Luminal-Na und Analeptika auf die Phosphatesterbildung bzw. Atmungskettenphosphorylierung von Rattenhirnhomogenaten. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 230, 547 (1957).

Drewes, L.R., Gilboe, D.D.: Glycolysis and the permeation of glucose and lactate in the isolated, perfused dog brain during anoxia and postanoxic recovery. J. biol. Chem. 248, 2489 (1973).

Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122, 501 (1955).

Earle, W.R.: Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Natl. Cancer Inst. 4, 165 (1943).

Eger, E.I., Brandstater, B., Saidman, L.J., Regan, M.J., Severinghaus, J.W., Munson, E.S.: Equipotent alveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, diethylether, fluroxene, cyclopropane, xenon and nitrous oxide in the dog. Anesthesiology 26, 771 (1965).

Fink, B.R., Kenney, G.E.: Long term reversible arrest of cell growth by amobarbital. Anesthesiology 32, 300 (1970).

Fleck, W., Krieglstein, J., Urban, W.: Zwei Apparaturen zur Perfusion des isolierten Rattenhirns. Arzneimittel-Forsch. 22, 1225 (1972).

Fromm, H.J., Zewe, V.: Kinetic studies of the brain hexokinase reaction. J. biol. Chem. 237, 1661 (1962).

Gatfield, P.D., Lowry, O.H., Schulz, D.W., Passonneau, J.V.: Regional energy reserves in mouse brain and changes with ischaemia and anaesthesia. J. Neurochem. 13, 185 (1966).

Gey, K.F., Rutishauser, M., Pletscher, A.: Suppression of glycolysis in rat brain in vivo by chlorpromazine, reserpine, and phenobarbital. Biochem. Pharmacol. 14, 507 (1965).

Glowinski, J., Iversen, L.L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain. J. Neurochem. 13, 655 (1966).

Gumaa, K.A., McLean, P.: Sequential control of hexokinase in ascites cells. Biochem. biophys. Res. Commun. 35, 824 (1969).

Hanke, J., Höfeler, H., Krieglstein, J., Wever, K.: The effect of centrally active drugs on the binding of hexokinase activity to mitochondria. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, R 62 (1979).

Hanke, J., Höfeler, H., Krieglstein, J., Wever, K.: Influence of various lipophilic drugs on brain mitochondrial hexokinase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Zur Publikation eingereicht 1979.

Hansch, C., Anderson, S.M.: The structure-activity relationship in barbiturates and its similarity to that in other narcotics. J. med. Chem. 10, 745 (1967).

Harding, H.E., Passey, R.D.: A transplantable melanoma of the mouse. J. Path. Bact. 33, 417 (1930).

Hein, H., Krieglstein, J., Stock, R.: The effects of increased glucose supply and thiopental anesthesia on energy metabolism of the isolated perfused rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289, 399 (1975).

Hering, E., Höfeler, H., Krieglstein, J., Wever, K.: Effects of anesthetics on the cellular regulation of energy metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, R 55 (1978).

Hernandez, A., Crane, R.K.: Association of heart hexokinase with subcellular structure. Arch. Biochem. Biophys. 113, 223 (1966).

Hochman, M.S., Sacktor, B.: Brain mitochondrial hexokinase: solubilization by adenine nucleotides and coupled respiration. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1546 (1973).

Hunter, F.E., Levy, J.F., Fink, J., Schultz, B., Guerra, F., Hurwitz, A.: Studies on the mechanism by which anaerobiosis prevents swelling of mitochondria in vitro: Effect of electron transport chain inhibitors. J. biol. Chem. 234, 2176 (1959).

Husain, S., Paradise, R.R.: Effect of halothane on CO_2 production from glucose, fructose and pyruvate in rat cerebral cortical slices. J. Neurochem. 21, 1161 (1973).

Jackson, S.H., Epstein, R.A.: The metabolic effects of nonvolatile anesthetics on mammalian hepatoma cells in vitro. Anesthesiology 34, 409 (1971).

Jalling, O., Lindberg, O., Ernster, L.: The effect of substituted barbiturates on mitochondrial respiration. Act. chem. scand. 9, 198 (1955).

Jalling, O., Löw, H., Ernster, L., Lindberg, O.: The relation of the site of action of amytal to oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta 26, 231 (1957).

Johnson, M.K.: The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat-brain homogenates and mitochondrial preparations. Biochem. J. 77, 610 (1960).

Karpatkin, S.: Soluble and particulate hexokinase of frog skeletal muscle. J. biol. Chem. 242, 3525 (1967).

Kiersey, D.K., Bickford, R.G., Faulconer, A., Jr.: Electro-encephalographic patterns produced by thiopental sodium during surgical operations: discription and classification. Brit. J. Anaesth. 23, 141 (1951).

Knabe, J., Rummel, W., Büch, H.P., Franz, N.: Optisch aktive Barbiturate. Synthese, Konfiguration und pharmakologische Wirkung. Arzneimittel-Forsch. 28, 1048 (1978).

Knull, H.R., Taylor, W.F., Wells, W.W.: Effects of energy metabolism on in vivo distribution of hexokinase in brain. J. biol. Chem. 218, 5414 (1973).

Knull, H.R., Taylor, W.F., Wells, W.W.: Insulin effects on brain energy metabolism and the related hexokinase distribution. J. biol. Chem. 249, 6930 (1974).

Knull, H.R.: Association of glycolytic enzymes with particulate fractions of nerve endings. Biochim. Biophys. Acta 522, 1 (1978).

Kosow, D.P., Rose, D.P.: Product inhibition of the hexokinases. J. biol. Chem. 245, 198 (1970).

Krebs, H.A., Henseleit, K.: Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 210, 33 (1932).

Krieglstein, G., Krieglstein, J., Stock, R.: Suitability of the isolated perfused rat brain for studying effects on cerebral metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 275, 124 (1972a).

Krieglstein, J., Stock, R.: Comparative study of the effects of chloral hydrate and trichloroethanol on cerebral metabolism. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 323 (1973).

Krieglstein, J., Stock, R.: The isolated perfused rat brain as a model for studying drugs acting on the CNS. Psychopharmacoligia (Berl.) 35, 169 (1974).

Krieglstein, J., Stock, R.: Energy metabolism of the isolated perfused rat brain as influenced by anesthetics. Biochem. Pharmacol. 24, 1579 (1975a).

Krieglstein, J., Bielicki, L.: The influence of thiopental on the intracellular distribution of hexokinase in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R 11 (1976).

Kropp, E.S., Wilson, J.E.: Hexokinase binding sites on mitochondrial membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 74 (1970).

Le Page, G.A.: Biological energy transformations during shock as shown by tissue analysis. Amer. J. Physiol. 146, 267 (1946).

Long, C.: Studies involving enzymic phosphorylation. I. The hexokinase activity of rat tissues. Biochem. J. 50, 407 (1952).

Lowry, O.H.: Metabolite levels as indicators of control mechanism. Fed. Proc. 25, 846 (1966).

Lowry, O.H., Passonneau, J.V.: The relationship between substrates and enzymes of glycolysis in brain. J. biol. Chem. 239, 31 (1964).

Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., Schulz, D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. biol. Chem. 239, 18 (1964).

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurment with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

Mark, L.C., Burns, J.J., Campomanes, C.I., Ngai, S.H., Trousof, N., Papper, E.M., Brodie, B.B.: The passage of thiopental into brain. J. Pharmacol. exp. Ther. 119, 35 (1957).

Mayman, C.I., Gatfield, P.D., Breckenridge, B. McL.: The glucose content of brain in anaesthesia. J. Neurochem. 11, 483 (1964).

McComb, R.B., Yushok, W.D.: Properties of particulate hexokinase of the Krebs-2 ascites tumor. Biochim. Biophys. Acta 34, 515 (1959).

McIlwain, H., Bachelard, H.S.: Biochemistry and the central nervous system. 4th edn. Edinburgh-London: Churchill Livingstone 1971.

Melander, Y.: The role of a secondary constriction of a tumor chromosome. Hereditas 49, 241 (1963).

Meyer, H.H.: Zur Theorie der Alkoholnarkose. I. Mitt. Welche Eigenschaft der Anästhetika bedingt ihre narkotische Wirkung? Arch. exp. Path. Pharmak. 46, 338 (1899).

Michenfelder, J.D., Theye, R.A.: In vivo toxic effects of halothane on canine cerebral metabolic pathways. Amer. J. Physiol. 229, 1050 (1975).

Miller, S.L.: A theory of gaseous anesthetics. Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A. 17, 481 (1961).

Moore, C.L., Jöbsis, F.F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparations. Arch. Biochem. Biophys. 138, 295 (1970).

Newsholme, E.A., Rollestone, F.S., Taylor, K.: Factors affecting the glucose-6-phosphate inhibition of hexokinase from cerebral cortex tissue of the guinea pig. Biochem. J. 106, 193 (1968).

Nilsson, L., Siesjö, B.K.: Influence of anesthetics on the balance between production and utilization of energy in the brain. J. Neurochem. 23, 29 (1974).

Östergreen, G.: Colchicine mitosis, chromosome contractions, narcosis, and protein chain folding. Hereditas 30, 429 (1944).

Overton, E.: Studien über die Narkose: Zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. Jena: G. Fischer, 1901.

Oyama, V.J., Eagle, H.: Measurement of cell growth in tissue cultures with a phenol reagent (Folin Ciocalteau). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 305 (1956).

Passonneau, J.V., Brunner, E.A., Molstad, C., Passonneau, R.: The effects of altered endocrine states and of ether anaesthesia on mouse brain. J. Neurochem. 18, 2317 (1971).

Pauling, L.: A molecular theory of general anesthesia. Science 134, 15 (1961).

Porsius, A.J., van Zwieten, P.A.: Anaesthetic agents and glycolysis. Lack of influence of anaesthetic agents on the activity of some enzymes involved in glycolysis. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 284, 399 (1974).

Quastel, J.H.: Respiration in the central nervous system. Physiol. Rev. 19, 135 (1939).

Rose, I.A., Warms, J.V.B.: Mitochondrial hexokinase: release, rebinding and location. J. biol. Chem. 242, 1635 (1967).

Rutishauser, M.: Beeinflussung des Kohlenhydratstoffwechsels des Rattenhirns durch Psychopharmaka mit sedativer Wirkung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 245, 396 (1963).

Sachs, L.: Angewandte Statistik, Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag 1974.

Saidman, L.J., Eger, E.I., Munson, E.S., Babad, A.A., Muallem, M.: Minimum aveolar concentrations of methoxyflurane, halothane, ether and cyclopropane in man: correlation with theories of anesthesia. Anesthesiology 28, 994 (1967).

Schachtschabel, D.O.: Biochemische und cytologische Untersuchungen zum Stoffwechsel, zur Teilung und Differenzierung von Zellen des Harding-Passey-Melanoms und Ehrlich-Ascites-Tumorzellen in Zellkultur. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi, Marburg 1969 a.

Schachtschabel, D.O., Zilliken, F., Saito, M., Foley, G.E.; Inhibition of DNA synthesis and chromosome aberrations in cultured Ehrlich ascites tumor cells following treatment with luteoskyrin. Exptl. Cell Res. 57, 19 (1969 b).

Schachtschabel, D.O., Ferro, J.J.: The effect of 4'-Aminopyrazolo(3,4d)pyrimidine and guanine on Ehrlich ascites tumor cells in culture. Exptl. Cell Res. 48, 319 (1967).

Schachtschabel, D.O.: Spezifische Zellfunktionen von Zell- und Gewebekulturen. I Züchtung von Melanin-bildenden Zellen des Harding-Passey-Melanons in Monolayer-Kultur. Virchows Arch. Abt. B Zellpathol. 7, 27 (1971).

Scholz, R., Schwarz, F., Bücher, Th.: Barbiturate und energieliefernder Stoffwechsel in der hämoglobinfrei durchströmten Leber der Ratte. Z. klin. Chem. 4, 179 (1966).

Seeman, P.: The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol. Rev. 24, 583 (1972).

Seeman, P., Kwant, W.O.: Membrane expansion of the erythrocyte by both the neutral and ionized forms of chlorpromazine. Biochim. Biophys. Acta 183, 512 (1969).

Smith, A.L., Wollman, H.: Cerebral blood flow and metabolism: Effect of anesthetic drugs and techniques. Anesthesiology 36, 378 (1972).

Strang, R.H.C., Bachelard, H.S.: Rates of cerebral glucose utilization in rats anaesthetized with phenobarbitone. J. Neurochem. 20, 987 (1973).

Suguira, K.: The effects of various physical and chemical factors on transplantable mouse melanoma. In: Biology of Melanomas New York Acad. Sci. (Special Publication) 4, 369 (1948).

Teichgräber, P., Biesold, D.: Properties of membrane-bound hexokinase in rat brain. J. Neurochem. 15, 979 (1968).

Teichgräber, P., Biesold, D., Arnold, R.: Zur Aktivierung der löslichen und mitochondrialen Hexokinase durch Triton X-100. Acta biol. med. germ. 30, 795 (1973).

Thompson, M.F., Bachelard, H.S.: Cerebral-cortex hexokinase. Biochem. J. 118, 25 (1970).

Traube, J.: Theorie der Osmose und Narkose. Arch. ges. Physiol. 105, 541 (1904).

Tuttle, J.P., Wilson, J.E.: Rat brain hexokinase: A kinetic comparison of soluble and particulate forms. Biochim. Biophys. Acta 212, 185 (1970).

Warburg, O.: Physikalische Chemie der Zellatmung. Biochem. Z. 119, 134 (1921).

Wéver, K., Bielicki, L., Krieglstein, J.: Solubilization of brain mitochondrial hexokinase in anesthesia. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 294, R 13 (1976).

Wilkin, G.P., Wilson, J.E.: Localization of hexokinase in neuronal tissue: Light microscopic studies with immunofluorescence and histochemical procedures. J. Neurochem. 29, 1039 (1977).

Wilson, J.E.: The latent hexokinase activity of rat brain mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 123 (1967).

Wilson, J.E.: Brain hexokinase. A proposed relation between soluble-particulate distribution and activity in vivo. J. biol. Chem. 243, 3640 (1968).

Wilson, W.S.: The effects of phenobarbital, leptazol, dexamphetamine, iproniazid, imipramine, LSD, chlorpromazine, reserpine and hydroxyzine on the in vivo levels of adenine nucleotides and phosphocreatine in the rat brain. Brit. J. Pharmacol. 36, 448 (1969).

Wu, R., Racker, E.: Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. J. biol. Chem. 234, 1029 (1959).

ABBILDUNGEN:

Die Bilder auf Seite 27 und Seite 29 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. D. Schachtschabel zur Verfügung gestellt.

7. TABELLENANHANG:

Einzelergebnisse

Tabelle 25 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo (Aufarbeitungszeit 120 Sekunden)

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	7,28	1,65	5,63
	7,92	1,71	6,21
	6,56	1,50	5,06
	7,20	2,30	4,90
	7,50	1,97	5,53
	7,23	2,22	5,01
	7,40	1,80	5,60
	7,10	1,94	5,16
Thiopental (150 mg/kg)	8,38	2,62	5,76
	6,99	2,54	4,45
	6,23	2,46	3,77
	6,91	2,78	4,13
	7,15	2,97	4,18
	7,56	3,27	4,29
	7,61	2,86	4,75
	8,12	2,94	5,18

Tabelle 26 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen nach Eintauchen und Durchfrieren in flüssigem Stickstoff

		Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)			
Kontrolle	Rohhomogenat	16,19	18,17	17,15	
	lösliche	4,95	4,91	4,91	
Thiopental (100 mg/kg)	Rohhomogenat	16,16	17,48	15,80	19,98
	lösliche	4,67	4,75	4,41	6,00

Tabelle 27 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo (Aufarbeitungszeit 90 Sekunden)

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	7,77	2,20	5,57
	9,43	2,05	7,38
	8,28	2,06	6,22
	7,72	2,04	5,68
	8,50	2,38	6,12
	8,63	2,29	6,34
	8,76	2,50	6,26
	8,04	1,91	6,13
Thiopental (150 mg/kg)	8,43	3,15	5,28
	9,41	2,93	6,48
	7,90	3,17	4,73
	8,04	2,79	5,25
	7,85	2,89	4,96
	8,71	3,22	5,49
	8,44	2,79	5,65
	9,24	2,65	6,59

Tabelle 28 : Einfluß von Thiopental auf die Verteilung der Hexokinaseaktivität zwischen der löslichen und der mitochondrialen Enzymform im Gehirn von Mäusen in vivo nach verschiedenen Präparationszeiten

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,99	10,93	12,17	13,07	11,26	11,42	12,22	13,30
lösliche	2,93	2,29	3,00	3,37	2,57	2,54	2,61	3,50
mitochondriale	10,06	8,64	9,17	9,70	8,69	8,87	9,61	9,80
	Thiopental (100 mg/kg) Präparationszeit: 45 Sekunden							
Rohhomogenat	12,16	13,02	12,65	13,34	11,25	12,01	13,99	12,22
lösliche	3,14	2,71	3,11	3,78	2,95	2,90	2,88	3,98
mitochondriale	9,02	10,31	9,45	9,56	8,30	9,11	11,10	8,24
	Kontrolle							
Rohhomogenat	13,53	10,99	12,22	12,75	11,74	11,62	12,81	12,27
lösliche	2,71	1,88	2,70	3,30	2,77	2,69	3,00	2,79
mitochondriale	10,82	9,11	9,52	9,45	8,97	8,93	9,81	9,48
	Thiopental (100 mg/kg) Präparationszeit: 60 Sekunden							
Rohhomogenat	11,84	12,54	12,11	11,95	11,53	11,78	13,39	12,97
lösliche	3,22	2,77	2,97	3,47	2,95	2,92	3,40	3,05
mitochondriale	8,62	9,77	9,14	8,48	8,58	8,86	9,99	9,92

Fortsetzung Tabelle 28

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,60	10,72	12,33	12,27	11,14	11,90	13,39	12,27
lösliche	2,80	1,87	2,73	2,94	2,58	2,98	2,83	2,64
mitochondriale	9,80	8,85	9,60	9,33	8,56	8,92	10,56	9,63
	Thiopental (100 mg/kg) Präparationszeit: 90 Sekunden							
Rohhomogenat	12,97	12,97	12,01	13,13	12,33	11,90	13,39	12,70
lösliche	3,22	2,75	3,04	3,39	3,56	2,94	2,95	2,89
mitochondriale	9,75	10,22	8,97	9,74	8,77	8,96	10,44	9,81
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,11	11,25	11,69	12,38	11,30	11,09	11,69	11,78
lösliche	2,71	1,83	2,37	2,89	2,52	2,52	2,34	2,73
mitochondriale	9,40	9,42	9,32	9,49	8,78	8,57	9,35	9,05
	Thiopental (100 mg/kg) Präparationszeit: 120 Sekunden							
Rohhomogenat	11,98	12,54	11,62	13,39	11,41	11,53	12,49	13,13
lösliche	3,23	2,72	3,09	3,78	2,89	2,89	3,09	3,33
mitochondriale	8,75	9,82	8,53	9,61	8,52	8,64	9,40	9,80

Tabelle 29 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität im Gehirn von Mäusen nach (verschiedenen) Narkosezeiten von 30 Minuten und 5 Minuten

Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)

	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,52	11,82	13,53	12,76	11,92	11,90	11,04	10,61
lösliche	2,62	2,64	2,12	2,51	2,51	2,50	2,98	2,29
	Thiopental (100 mg/kg) Narkosezeit: 30 Minuten							
Rohhomogenat	12,06	11,82	12,24	11,15	13,56	13,02	12,72	12,38
lösliche	3,41	3,92	3,64	3,38	3,75	3,85	3,30	3,19
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,33	12,33	12,96	11,78	11,25	12,21	12,05	11,36
lösliche	2,68	2,29	2,36	2,21	2,29	2,35	2,34	2,30
	Thiopental (100 mg/kg) Narkosezeit: 5 Minuten							
Rohhomogenat	12,54	12,49	12,86	12,59	11,36	11,68	12,21	10,71
lösliche	3,65	3,68	3,68	3,53	3,44	3,53	3,22	3,11

Tabelle 30 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Gehirnen von Mäusen, Ratten und Meerschweinchen

Mäuse	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	11,26	11,41	11,14	11,30	11,74	11,62	11,30	11,09
lösliche	2,57	2,54	2,58	2,52	2,77	2,69	2,52	2,52
	Thiopental (100 mg/kg)							
Rohhomogenat	11,25	11,99	11,41	11,90	11,53	11,78	11,41	11,53
lösliche	2,95	2,99	2,89	2,98	2,95	2,94	2,89	2,89
Ratten	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,45	12,40	12,37	12,51	12,59	12,17	12,31	12,02
lösliche	2,51	2,45	2,44	2,72	2,64	2,23	2,40	2,21
	Thiopental (80 mg/kg)							
Rohhomogenat	12,11	12,43	12,75	12,30	12,23	12,59	12,81	12,70
lösliche	3,21	2,77	3,26	3,11	2,93	2,92	2,79	2,74

Fortsetzung Tabelle 30

Meerschweinchen	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,75	12,72	12,96	12,75	12,59	12,48	12,70	12,80
lösliche	2,54	2,43	2,54	2,46	2,51	2,49	2,48	2,41
	Thiopental (32 mg/kg)							
Rohhomogenat	13,55	13,34	12,59	12,70	13,34	13,18	13,39	13,18
lösliche	2,86	2,85	2,90	2,78	2,87	2,86	2,80	2,84

Tabelle 31 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Gehirnen von Mäusen in einzelnen Narkosestadien

Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)

Kontrolle						
Rohhomogenat	11,89	11,41	12,70	11,89	11,42	12,69
lösliche	2,72	2,62	2,62	2,33	2,34	2,71
1 Minute nach Thiopentalinjektion						
Rohhomogenat	11,95	12,43	12,96	11,84	12,42	11,85
lösliche	2,09	2,14	2,18	2,06	2,15	2,05
2 Minuten nach Thiopentalinjektion						
Rohhomogenat	11,89	11,95	12,35	12,27	11,90	12,25
lösliche	2,55	2,56	2,81	2,66	2,57	2,69
3 Minuten nach Thiopentalinjektion						
Rohhomogenat	12,22	11,53	11,74	12,54	12,25	11,84
lösliche	3,33	3,00	3,12	3,40	3,29	3,13
5 Minuten nach Thiopentalinjektion						
Rohhomogenat	11,95	12,43	12,96	11,84	12,53	11,90
lösliche	3,66	3,76	3,57	3,78	3,71	3,67

Fortsetzung Tabelle 31

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle III			*				
Rohhomogenat	12,43	12,41	11,90	12,04	11,85	11,71	12,44	12,24
lösliche	?,15	2,73	2,17	2,69	2,79	2,32	2,79	2,65
	2 Stunden nach Thiopentalinjektion							
Rohhomogenat	12,38	11,99	12,23	11,91	12,15	12,56	11,61	12,12
lösliche	2,82	2,91	2,86	2,78	2,97	3,27	2,86	2,94
	3 Stunden nach Thiopentalinjektion							
Rohhomogenat	12,37	12,45	12,45	12,35	11,91	12,49	12,19	12,53
lösliche	2,32	2,68	2,47	2,42	2,01	2,33	2,21	2,41
	5 Stunden nach Thiopentalinjektion							
Rohhomogenat	12,28	11,92	12,23	12,20	11,50	12,23	12,40	12,10
lösliche	2,65	2,71	?,50	2,30	2,97	2,22	2,80	2,94

Tabelle 32 : Dosisabhängiger Anstieg der löslichen Hexokinaseaktivität im isoliert perfundierten Rattenhirn nach Thiopental

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)								
	Kontrolle								
Rohhomogenat	14,47	12,59	13,13	13,13	12,75	12,43	13,07	13,94	13,07
lösliche	2,45	2,40	2,44	2,51	2,64	2,42	2,31	2,83	2,53
	Thiopental (0,05 mM)								
Rohhomogenat	12,27	12,70	12,97	13,55	13,50				
lösliche	3,19	2,79	2,76	2,70	2,80				
	Thiopental (0,1 mM)								
Rohhomogenat	12,70	12,97	13,55	12,17	13,23				
lösliche	2,47	2,89	3,48	2,84	2,87				
	Thiopental (0,2 mM)								
Rohhomogenat	12,11	12,33	12,97	12,27	13,39				
lösliche	3,15	3,12	3,02	2,99	2,82				

Fortsetzung Tabelle 32

	Hexokinaseaktivität in U/g Gehirn (Feuchtgewicht)				
	Thiopental (0,3 mM)				
Rohhomogenat	13,30	12,97	12,65	13,78	13,62
lösliche	2,93	3,04	3,05	3,03	3,68
	Thiopental (0,5 mM)				
Rohhomogenat	12,70	13,94	12,75	13,72	13,13
lösliche	3,47	3,35	3,05	3,11	3,48
	Thiopental (0,8 mM)				
Rohhomogenat	13,18	13,39	12,86	13,94	13,62
lösliche	3,32	3,80	3,38	3,40	3,50

Tabelle 33a : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratten

Hirngewichte in mg (Feuchtgewicht)

Cortex	Cerebellum	Medulla + Pons	Rest
Kontrollen			
610	200	220	340
810	260	210	220
720	230	220	400
700	230	300	300
700	190	200	430
740	250	230	340
800	260	250	400
740	230	210	370
Thiopental (80 mg/kg)			
700	200	230	300
650	190	280	360
800	230	220	330
700	230	220	330
710	200	190	400
780	240	300	380
800	240	230	390
730	230	210	400

Tabelle 33b : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in verschiedenen Hirnstrukturen der Ratten

Hexokinaseaktivität in U/g (Feuchtgewicht)

Kontrolle: Cortex								
Rohhomogenat	14,52	14,20	13,39	14,20	13,30	15,27	13,39	13,94
lösliche	2,41	2,36	2,38	1,93	2,49	2,47	2,42	2,47
Thiopental (80 mg/kg)								
Rohhomogenat	13,78	15,22	14,80	15,43	14,68	15,39	14,20	14,04
lösliche	2,69	2,52	3,48	2,76	2,95	3,23	2,85	3,43
Kontrolle: Cerebellum								
Rohhomogenat	14,04	13,94	12,68	13,50	14,43	13,67	13,71	13,80
lösliche	2,79	2,79	2,70	2,47	2,68	2,54	2,66	2,64
Thiopental (80 mg/kg)								
Rohhomogenat	13,71	13,55	13,39	13,78	14,31	14,47	14,58	13,46
lösliche	2,89	2,77	3,11	2,94	3,16	3,75	3,41	3,35

Fortsetzung Tabelle 33b

	Hexokinaseaktivität in U/g (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle: Medulla und Pons							
Rohhomogenat	10,50	9,05	10,77	9,00	9,12	10,18	9,69	9,92
lösliche	2,14	2,06	2,14	1,93	2,09	2,25	2,16	2,11
	Thiopental (80 mg/kg)							
Rohhomogenat	10,45	11,09	10,72	9,49	8,31	10,45	9,69	9,92
lösliche	2,56	2,31	2,76	2,54	2,40	2,73	2,64	2,60
	Kontrolle: Rest des Gehirns							
Rohhomogenat	11,95	12,33	10,18	11,14	12,11	12,06	10,24	10,61
lösliche	2,03	2,16	1,67	1,78	2,10	1,79	2,02	1,77
	Thiopental (80 mg/kg)							
Rohhomogenat	10,61	11,78	11,25	10,34	11,04	10,82	10,45	11,53
lösliche	2,27	1,84	2,53	2,22	2,43	2,57	2,36	2,44

Tabelle 34 : Einfluß lipiphiler Pharmaka auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in der Hirnrinde der Ratte

	Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	11,78	11,95	11,78	13,18	12,33	11,78	12,65	13,07
lösliche	2,18	2,08	1,96	2,14	2,12	2,19	2,00	2,12
	Amphetamin (25 mg/kg)							
Rohhomogenat	11,30	12,01	12,38	10,93	11,37	11,04	12,06	11,58
lösliche	2,13	2,15	2,13	2,03	2,25	2,04	2,09	2,00
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,22	11,78	11,90	11,90	11,69	12,59	12,38	11,78
lösliche	2,45	1,93	2,11	1,86	2,14	2,14	1,82	1,87
	Chlorpromazin (25 mg/kg)							
Rohhomogenat	11,78	11,78	11,90	11,78	10,56	12,54	12,75	11,95
lösliche	2,69	2,47	2,36	2,31	1,84	1,82	2,25	1,99

Fortsetzung Tabelle 34

	Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,01	12,01	12,86	12,43	12,43	13,94	13,78	13,67
lösliche	2,19	2,25	2,19	2,37	2,53	2,41	2,15	2,14
	Diazepam (25 mg/kg)							
Rohhomogenat	13,39	13,30	12,97	12,59	12,01	12,49	12,54	13,50
lösliche	3,33	2,72	2,86	2,59	2,39	2,93	2,94	2,87
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,49	12,56	13,02	12,65	13,39	12,33	12,56	12,56
lösliche	2,23	1,98	2,08	1,84	2,22	1,98	2,00	1,91
	Ethanol (5 g/kg)							
Rohhomogenat	13,39	12,86	14,20	12,43	13,39	13,07	12,49	12,43
lösliche	2,98	2,72	2,52	2,49	2,61	2,21	2,32	2,31

Fortsetzung Tabelle 34

	Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	11,14	12,54	11,90	12,33	12,86	13,18	12,22	11,85
lösliche	2,14	2,52	2,16	1,92	2,08	2,10	2,00	1,82
	Haloperidol (20 mg/kg)							
Rohhomogenat	12,22	12,06	11,95	11,78	13,39	13,02	13,23	11,85
lösliche	2,49	2,49	2,23	2,20	2,51	2,39	2,07	2,12
	Kontrolle							
Rohhomogenat	11,58	12,33	11,78	12,17	11,78	12,54	11,25	11,69
lösliche	1,93	2,09	2,19	2,07	2,32	2,07	2,35	2,06
	N_2O (80 %) O_2 (20 %)							
Rohhomogenat	12,01	12,94	12,06	11,25	11,85	12,55	11,41	10,98
lösliche	2,25	2,34	2,82	2,19	2,25	2,39	2,95	2,20

Fortsetzung Tabelle 34

	Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,95	12,01	11,25	12,86	12,33	11,25	11,25	11,53
lösliche	2,16	2,13	1,93	2,00	1,93	2,11	2,00	1,89
	R(-)-Barbiturat							
Rohhomogenat	11,37	12,06	12,17	12,22	11,78	12,06	11,53	12,27
lösliche	2,77	2,80	2,47	2,79	2,47	2,47	2,79	2,88
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,95	12,86	12,86	12,49	11,78	11,78	12,06	12,43
lösliche	2,37	2,47	2,20	2,11	2,32	2,54	2,15	2,04
	S(+)-Barbiturat							
Rohhomogenat	11,25	12,65	12,75	11,37	10,77	11,53	12,59	11,25
lösliche	2,36	2,55	2,32	2,20	2,57	2,68	2,36	2,20

Fortsetzung Tabelle 34

Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)

	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,70	12,70	12,54	12,75	12,59	12,49	11,95	11,95
lösliche	2,57	2,32	2,00	1,71	1,82	1,77	1,79	1,80
	Perphenazin (10 mg/kg)							
Rohhomogenat	12,65	13,18	12,70	13,07	12,43	12,33	12,06	13,13
lösliche	2,61	2,68	2,19	2,11	1,96	1,79	1,93	2,19
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,59	13,30	12,33	9,65	12,33	13,39	12,86	9,37
lösliche	2,04	2,04	2,22	2,04	1,98	2,34	2,31	2,24
	Phenylbutazon (150 mg/kg)							
Rohhomogenat	14,04	13,39	12,33	10,72	13,94	13,67	12,33	11,25
lösliche	2,09	2,20	2,41	2,26	2,11	2,14	2,09	2,05

Fortsetzung Tabelle 34

	Hexokinaseaktivität in U/g Cortex (Feuchtgewicht)							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	10,93	13,13	11,62	12,33	10,98	12,54	11,58	13,02
lösliche	2,43	2,44	2,18	2,02	2,31	2,21	1,99	2,13
	Phenytoin (300 mg/kg)							
Rohhomogenat	13,67	12,11	13,55	13,07	13,39	11,37	12,38	12,33
lösliche	2,47	2,57	2,43	2,42	2,68	2,27	2,48	2,47
	Kontrolle							
Rohhomogenat	12,59	12,59	13,30	12,22	13,30	11,78	11,90	13,50
lösliche	2,08	1,94	1,93	1,79	2,36	2,23	2,11	2,06
	Propanidid (0,50 g/kg)							
Rohhomogenat	13,13	12,59	12,86	13,94	12,86	12,59	13,34	13,50
lösliche	2,41	2,57	3,02	2,49	2,50	2,76	3,00	2,76

Tabelle 35 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Ascites-Zellen aus Mäusen nach Inkubation in vitro

	Hexokinaseaktivität in U/g Protein		
	Rohhomogenat	lösliche	mitochondriale
Kontrolle	108	16	92
	109	14	95
	104	16	88
	106	18	88
Thiopental (1×10^{-3} M)			
	110	40	70
	107	32	75
	97	31	66
	93	29	64

Tabelle 36 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in Ascites-Zellen in vitro

	Hexokinaseaktivität in U/g Protein	
	Rohhomogenat	lösliche
Kontrolle	119	15
	109	16
	111	17
	86	14
	89	19
	87	16
	119	21
	105	18
Thiopental (1×10^{-3} M)	97	26
	116	30
	106	29
	105	32
	88	25
	92	25
	101	32
	109	32

Tabelle 37 : Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in HPM-Zellen in vitro

	Hexokinaseaktivität in U/g Protein	
	Rohhomogenat	lösliche
Kontrolle	125	33
	135	37
	154	42
	133	36
	151	34
	126	37
	110	33
	105	31
Thiopental (1×10^{-3} M)	114	41
	135	51
	145	56
	151	65
	123	50
	110	44
	111	41
	139	58

Tabelle 38 : Einbau von ^{3}H-Thymidin in die DNS von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

	cpm/mg Zellprotein		
Inkubationszeit (Stunden)	1	8	24
Thiopental (M)			
0	7562	74382	148211
	7920	81377	144379
1×10^{-4}	7026	78739	140569
	6935	77168	150111
$3{,}3 \times 10^{-4}$	6350	76608	134588
	6417	75012	103945
1×10^{-3}	5476	69891	96610
	5631	67921	91483

Tabelle 39 : Einbau von ^{14}C-Leucin in Protein von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

	cpm/mg Zellprotein		
Inkubationszeit (Stunden)	1	8	24
Thiopental (M)			
0	2646	17723	38400
	2971	16324	40473
1×10^{-4}	2690	16774	36388
	3071	17566	37633
$3{,}3 \times 10^{-4}$	2408	16465	41869
	2752	17936	38284
1×10^{-3}	2380	15842	34865
	2637	16939	34855

Tabelle 40 : Proteinzunahmerate von HPM-Zellen in Abhängigkeit von der Thiopentalkonzentration im Medium

	µg Zellprotein		
Inkubationszeit (Stunden)	1	8	24
Thiopental (M)			
0	475	560	828
	476	608	857
1×10^{-4}	458	579	820
	476	590	891
$3{,}3 \times 10^{-4}$	471	583	758
	468	593	711
1×10^{-3}	492	603	636
	477	593	592

Tabelle 41 : Dosisabhängiger Einfluß von Thiopental auf die intrazelluläre Verteilung der Hexokinaseaktivität in HPM-Zellen in vitro

	Hexokinaseaktivität in U/g Protein							
	Kontrolle							
Rohhomogenat	139	100	107	128	126	124	146	145
lösliche	30	21	34	42	36	34	45	47
	Thiopental ($3{,}3 \times 10^{-5}$)							
Rohhomogenat	123	114	157	157	137	120	119	119
lösliche	44	27	59	28	38	39	38	48
	Thiopental (1×10^{-4} M)							
Rohhomogenat	126	134	106	139	139	152	120	106
lösliche	45	50	36	56	55	50	46	37
	Thiopental ($3{,}3 \times 10^{-4}$ M)							
Rohhomogenat	113	139	99	148	129	129	134	127
lösliche	40	47	42	63	57	44	54	56

8. LEBENSLAUF

1946	geboren am 14. März in Hersfeld Eltern: Apotheker Rudolf Wever und Elisabeth Wever, geb. Hentschel
1950	Umzug nach Friedewald Kreis Hersfeld
1952 - 1956	Besuch der Volksschule in Friedewald
1956 - 1964	Besuch der Alten Klosterschule in Bad Hersfeld
1964 - 1966	Besuch der Melanchthon-Schule in Steinatal
1966	Abitur am 7. November
1966 - 1969	Apothekenpraktikum in Bad Hersfeld und Hünfeld
1969	Pharmazeutische Vorprüfung am 10. März in Kassel
1969 - 1971	Apothekerassistent
1971 - 1974	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
1974	Pharmazeutisches Staatsexamen am 23. Juli Erteilung der Approbation am 5. August
1974 - 1979	Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie im Fachbereich Pharmazie und Lebensmittelchemie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
1975	Seit dem 1. Juli wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
1976	Eheschließung mit der Apothekerin Annelies Wever geb. Hünerberg am 30. Juli

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens von Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein (Kr 354/9) von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.